Immunmodulation durch
Litomosoides sigmodontis (Nematoda, Filarioidea)
und *Echinococcus multilocularis* (Cestoda):

Auswirkungen einer Helmintheninfektion auf eine LPS-induzierte Sepsis und Identifizierung einer anti-inflammatorischen Substanz

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

Marc Peter Hübner
aus Leonberg

vorgelegte
D i s s e r t a t i o n

2006

Tag der mündlichen Prüfung:	21.11.2006
Dekan:	Prof. Dr. F. Schöffl
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Schulz-Key
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-G. Rammensee

Danksagung

Bei Prof. Hartwig Schulz-Key möchte ich mich für die nette Aufnahme in der Arbeitsgruppe, für die Erstellung des Erstgutachtens und die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Prof. Hans-Georg Rammensee danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Wolfgang Hoffmann danke ich für die Betreuung der Arbeit, der Unterstützung im Praktischen und Theoretischen und der erfolgreichen Vermittlung meiner zukünftigen Postdoc-Stelle.

Prof. Peter Soboslay danke ich für die Ratschläge, Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Vielen Dank auch für die Hilfe beim gemeinsamen Paper!

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Kalbacher bedanken, der mir mit Rat und Tat bei der Identifikation einer aktiven Komponente geholfen hat und in dessen Labor ich die HPLC durchführen durfte.

Alexander Beck möchte ich ebenfalls danken, der maßgeblich an der Identifizierung der aktiven Komponente beteiligt war.

Prof. Stefan Stefanovic danke ich für Identifikation der Aminosäuresequenz der aktiven Komponente.

Svetoslav Kalaydjiev danke ich für die Durchführung der Zell- und Antikörperanalyse.

Andreas Lengeling und Bastian Pasche danke ich für die Bestimmung der Zytokinwerte mittels Luminex.

Michael Bonin danke ich für die durchgeführten Microarray-Analysen und deren Auswertung.

Recht herzlich möchte ich mich bei der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und dem Nationalen Genomforschungsnetzwerk (NGFN) des BMBF (01GSO403) sowie beim *fortüne*-Programm der Universität Tübingen (1246-0-0 und 1041-0-0) für die finanzielle Unterstützung bedanken.

1 Einleitung 1
1.1 Immunmodulation durch Helminthen 1
1.2 Sepsis 5
1.3 Entwicklungszyklus von *Litomosoides sigmodontis* 8
1.4 Entwicklungszyklus von *Echinococcus multilocularis* 9
1.5 Immunologie bei der alveolären Echinokokkose 11
1.6 Verwendung der Parasiten *L. sigmodontis* und *E. multilocularis* 13
1.7 Zielsetzung der Arbeit 13
2 Material und Methoden 15
2.1 Blutspender 15
2.2 Versuchstiere 15
2.3 Narkotisierung und Markierung der Versuchstiere 17
2.4 Töten von Versuchstieren 17
2.5 Haltung des Parasiten *L. sigmodontis* 18
2.5.1 Isolierung von Mikrofilarien 19
2.5.2 Mikrofilarieninfektion 20
2.5.3 Quantifizierung der Mikrofilarien 20
2.5.4 Gewinnung von adulten Filarien 21
2.5.5 Implantation von adulten Filarien 21
2.6 Zyklushaltung von *Echinococcus multilocularis* 22
2.6.1 Isolierung von Metacestodengewebe 22
2.6.2 Metacestodenkultur 22
2.6.3 Kultivierung in serum- bzw. proteinfreien Medien 23
2.6.4 Infektion von Rennmäuse 23
2.6.5 Infektion von DBA/1- und DBA/2-Mäusen 24
2.7 Injektion von LPS 24
2.8 Temperaturmessung 24
2.9 Plasmagewinnung 24
2.10 Zytokin-, Chemokin- und Antikörperbestimmung 25
2.10.1 ELISA zur Bestimmung muriner Zytokine 25
2.10.2 Zytokin/Chemokin-Bestimmung mittels Luminex 26
2.10.3 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand humaner Zellen 27
2.10.4 Antikörperbestimmung 29
2.11 Zellanalyse mittels FACS 29
2.12 Isolierung humaner peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) 31
2.13 Stimulierung humaner PBMC *in vitro* 31
2.14 Bestimmung der Genexpression mittels DNA-Microarray-Analyse 33
2.15 Fraktionierung des EmMed 34
2.15.1 HPLC 34
2.15.2 PD-10-Säule 35
2.16 LC/ESI-MS-Analyse und Edman-Abbau 36
2.17 Synthese von Fibrinopeptid B 37
2.18 Protein-Quantifizierung nach dem BCA-Verfahren 37
2.19 Hitzeinaktivierung des EmMed 38
2.20 Medien, Puffer und andere Lösungen 38
2.21 Statistik 40

3 Ergebnisse 41
3.1 Sepsisversuch mit *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen 41
3.1.1 Zytokinproduktion ... 41
3.1.2 Zytokinproduktion von ko-Mäusen ... 55
3.1.3 Prozentuale Veränderung der Zytokinausschüttung ... 63
3.1.4 Mittels Luminex ermittelte Zytokin-und Chemokinproduktion ... 66
3.1.5 Überlebensrate ... 72
3.1.6 Zellpopulationen und Ig-Konzentration ... 73
3.1.7 Verlauf der Körpertemperatur ... 84
3.2 Immunmodulation durch *E. multilocularis* 87
3.2.1 Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand ... 87
3.2.2 Genexpression der LPS-stimulierten PBMC ... 94
3.2.3 Identifizierung von anti-inflammatorisch wirkenden Substanzen ... 97
3.2.3.1 Hitzeinaktiviertes EmMed ... 97
3.2.3.2 Metacestoden in serumfreien oder Serumersatzmedien ... 97
3.2.3.3 EmMed-Fraktionen der PD-10-Säule ... 98
3.2.3.4 EmMed-Fraktionen der HPLC ... 99
3.2.3.5 Identifizierung der aktiven Komponente ... 101
3.2.3.6 Dosis-Wirkungs-Kurve von Fibrinopeptid B ... 104
3.2.4 Sepsisversuch mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/1-Mäusen ... 105
3.2.4.1 Zytokinproduktion ... 106
3.2.4.2 Überlebensrate und Nachweis der *E. multilocularis* Infektion ... 109
3.2.5 Sepsisversuch mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/2-Mäusen ... 110
3.2.5.1 Zytokinproduktion ... 111
3.2.5.2 Verlauf der Körpertemperatur ... 114
3.2.5.3 Überlebensrate und Nachweis der *E. multilocularis*-Infektion ... 115
4 Diskussion 117
4.1 Sepsisversuche mit *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen 117
4.1.1 Sepsisversuch durch LPS-Injektion ... 117
4.1.2 Mikrofilarien-infizierte Mäuse ... 118
4.1.3 Mikrofilarien-infizierte knockout-Mäuse ... 124
4.1.4 Mäuse mit weiblichen Filarien aus patenten Infektionen ... 125
4.1.5 Mäuse mit Filarien aus postpatenten Infektionen ... 126
4.1.6 Mäuse mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen ... 127
4.1.7 Zusammenfassung der Sepsisversuche mit *L. sigmodontis* ... 128
4.2 Immunmodulation durch *E. multilocularis* 132
4.2.1 Sepsisversuch in *E. multilocularis*-infizierten Mäusen ... 133
4.2.2 Veränderte Zytokinausschüttung durch EmMed bzw. EmVes ... 135
4.2.3 Genexpressionsanalyse von LPS-stimulierten Zellen mit EmMed ... 137
4.2.4 Aktive Komponente im EmMed ... 140
4.3 Ausblick 142
5 Zusammenfassung 144
6 Literaturverzeichnis 146
7 Anhang 161
7.1 Manuskript: Hübner et al. 2006 161
7.2 Lebenslauf 179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*p	Signifikanz
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
AAMP	Alternativ aktivierte Makrophagen
AB	Antibiotika/Antimykotika
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
AE	Alveoläre Echinokokkose
ATZ	Anilinothiazolinon
Balb	Bagg Albino
BAT1	HLA-B-associated transcripts
BCA	Bicinchoninsäure
BPI	Bactericidal permeability increasing protein
BS	Blutspender
BSA	Bovines Serumalbumin
CC	Chemokine-activated killer cells
CD Hybridoma Medium	Chemically defined Hybridoma Medium
CD	Cluster of differentiation
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CXCl	CXC-Chemokinligand
d. p. i.	Days post infection
DBA	Dilute brown non agouti
DC	Dentritische Zellen

EAE	Experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EmMed	*E. multilocularis* Metacestodenkulturüberstand
EmVes	EmMed mit Vesikeln
EphA1	Ephrinrezeptor A1
ES-62	Excretory-secretory-62
EST	Expressed sequence tags
et al.	Et alteri
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötales Bovines Serum
FGF	Fibroblast growth factor
Fc	Fragment crystallisable
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Kanülengröße
GITR	Glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene
GMCSF	Granulozyten- Monozyten- Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunden
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_2O_{bd}	Wasser bidest
H_2SO_4	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish peroxidase

HSPA1A	Heatshock protein 1A
i. m.	Intra musculär
i. p.	Intra peritonial
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP-10	IFN-inducible protein 10
IRAK	Interleukin-1 rezeptor associated kinase
ITGA7	Integrin alpha 7
IVC	Individually ventilated cages
KC	Keratinocyte chemokine
KCl	Kaliumchlorid
Da	Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
ko	Knockout
L	Larvenstadium
l	Liter
LC/ESI-MS	Liquid Chromatography/Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
LFA-1	Lymphozytenfunktion-Antigen-1
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
Mf	Mikrofilarien

MHC	Major Histocompability Complex
MIF	Migration inhibition factor
MIG	Monokine induced by gamma-interferon
min	Minuten
MIP-1α	Macrophage inflammatory protein-1α
ML	Mikrofilarien- und LPS-Injektion
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MP	Mikrofilarien- und PBS-Injektion
MyD88	Myeloid differentiation primary-response protein 88
n	Anzahl
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
NFATC	Nuclear factor of activated T-cells
NFκB	Nukleärer Faktor-κB
ng	Nanogramm
NH_4Cl	Ammoniumchlorid
Nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	Non-obese diabetic
OASL	2´5´Oligoadenylatsynthetase-like
P	Peak(s)

PBMC	Periphereral blood mononuclear cell(s)
PBS	Phophate Buffered Saline
pg	Picogramm
PGRP	Peptidoglykan-recognition Proteine
pH	Pondus Hydrogenii
PHA	Phytohaemagglutinin
PITC	Phenylisothiocyanat
PTC-Peptid	Phenylthiocarbamoylpeptid
PTH	Phenylthiohydantoin
RPMI	Roswell-Park-Memorial-Institute-Zellmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
Scheinimpl.	Scheinimplantation
Scheinbeh.	Scheinbehandlung
SEA	Soluable Egg Antigen
SES	Serumersatz
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
SL	Schein- und LPS-Injektion
SLE	Systmischer Lupus Erythematodes
SP	Schein- und PBS-Injektion
SR	Scavanger Rezeptor
Streptavidin-PE	Streptavidin –Phycoerythrin
Tab.	Tabelle
TCR-V	T-Zellrezeptor V
TFA	Trifluoressigsäure

TGF	Transforming Growth Factor
T_H	T-Helferzellen
THP1	Human acute monocytic leukemia cell line
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-Rezeptor
t-PA	Tissue plasminogen factor
ü. N.	über Nacht
UGU	Human Genetics Unit
UV	Ultra-Violett
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vgl.	Vergleich
vor Inj.	Vor Injektion
WSP	Wolbachia surface protein

1 Einleitung

Helminthen – das sind endoparasitische Nemathelminthen und Plathelminthen – persistieren in ihren Wirten oft jahre- oder sogar jahrzehntelang. Dies erreichen sie dadurch, indem sie die Immunantwort ihres Wirtes erfolgreich modulieren. So werden Parasitenstadien vom Immunsystem teilweise nicht erkannt, Entzündungsreaktionen gehemmt, d. h. pathologische Veränderungen treten kaum oder erst nach langer chronischer Infektion auf.

Schon wenige Parasiten reichen oft aus, eine Reaktion drastisch zu supprimieren. Dieses immunsupprimierende Potential lässt sich manchmal auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien nutzen, wo es gilt inadäquate oder überschießende Immunantworten zu unterdrücken, was in der Regel nur durch eine Steroidbehandlung gelingt. Erstaunliche Erfolge durch den Einsatz von Helminthenstadien wurden bereits bei Morbus Crohn-Patienten oder Asthma erzielt.

Ob solche Infektionen auch akute Entzündungsantworten bei einer Sepsis günstig beeinflussen können, soll in der vorliegenden Arbeit experimentell in einem Tierversuch mit zwei Helminthen sehr unterschiedlicher systematischer Gruppen untersucht werden.

1.1 Immunmodulation durch Helminthen

Infektionen mit Helminthen sind in der Natur sehr häufig. Sie haben auch den Menschen als Wirt erfolgreich erobert und sind bei über 25% der Weltbevölkerung zu finden. Davon gehen die meisten Infektionen, geschätzte 2 Mrd., auf intestinale Nematoden zurück (Savioli et al. 2002), mit extraintestinalen Nematoden, meist Filarien, sind schätzungsweise 150-200 Millionen Menschen infiziert. Ihr Erfolgsrezept besteht u. a. in der Fähigkeit, die Immunantwort ihrer Wirte sehr wirkungsvoll zu modulieren.

In den letzten Jahren konnten bei Helmintheninfektionen immer häufiger eine solche Modulation der Immunantwort nachgewiesen werden, wodurch die Parasiten besser toleriert und mögliche Entzündungsprozesse unterdrückt werden. Die vom Parasiten induzierte Immunsuppression hat zwar eine hohe Mikrofilarienlast zur Folge, verhindert aber größere pathologische Veränderungen. Erstaunlicherweise reicht die Implantation eines einzigen jungen adulten Weibchens der Filarie *Litomosoides sigmodontis* diesen Effekt im Wirt zu erzielen und lässt Mikrofilarien länger leben (Hoffmann et al. 2001 A).

Die typische Reaktion auf eine Helminthen-Infektion ist eine T_H2-Immunantwort, die durch die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, sowie IgE und eine Zunahme von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen gekennzeichnet ist (Maizels et al. 2004). Patienten mit Filarien haben gleichzeitig eine deutlich reduzierte Antigen-spezifische T-Zell-Antwort (Greene et al. 1983). Die verminderte Proliferation von T-Zellen auf Filarienantigen geht dabei nicht auf eine Anergie der Zellen zurück, sondern auf eine gezielte Suppression der Immunantwort durch IL-10 und TGFβ (Doetze et al. 2000, King et al. 1993), aber auch auf von Parasiten induzierte regulatorische T-Zellen (Satoguina et al. 2002, Hesse et al. 2004). So konnte mit Antikörpern gegen die regulatorischen T-Zell-Oberflächenmarker CD25 und GITR (**g**lucocorticoid-**i**nduced **T**NF **r**eceptor family-related gene), welche als Co-Stimulatoren auf Effektor-T-Zellen exprimiert werden, in Mäusen mit der Nagetierfilarie *L. sigmodontis* die Adultwurmlast reduziert und eine erhöhte Immunantwort gegenüber Parasitenantigenen hergestellt werden (Taylor et al. 2005). Weiterhin von Bedeutung sind **a**lternativ **a**ktivierte **M**akro**p**hagen (AAMP), welche ebenfalls bei Parasiten-Infektionen vorkommen (Loke et al. 2002, Rodriguez-Sosa et al. 2002). AAMP sind in der Lage, Entzündungsreaktionen durch den Parasiten zu hemmen und die T_H2-Immunantwort zu fördern (Taylor et al. 2006, Rodriguez-Sosa et al. 2002, Terrazas et al. 2001, Maizels et al. 2004).

Die Immunsuppression hält nur solange an, wie Parasiten vorhanden sind, und wird z. B. *in vivo* durch eine kurative Medikation aufgehoben (Sartano et al. 1995). Sie wird v. a. vom Parasiten gezielt induziert, z. B. durch bestimmte Moleküle. So konnten bei *Brugia malayi* zwei Homologe zu den Wirtszytokinen TGFβ und MIF (**m**igration **i**nhibitory **f**actor) gefunden werden (Beall et al. 2000, Zang et al. 2002). Das Parasiten-induzierte TGFβ (Bm-TGH-2) kann dabei an den Wirts-TGFβ-Rezeptor binden (Gomez-Escobar et al. 2000). Das von *B. malayi* freigesetzte MIF (Bm-MIF) fördert die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Zang et al. 2002), ist aber eventuell auch an der alternativen Differenzierung der Makrophagen beteiligt (Falcone et al. 2001, Maizels et al. 2004). Bei den Nagetierfilarien *Acanthocheilonema viteae* und *L. sigmodontis* sowie den humanpathogenen Filarien *O. volvulus* und *B. malayi* konnte der Cystein-Protease-Inhibitor Cystatin gefunden werden, der von lebenden Würmern freigesetzt wird und durch IL-10 die Immunantwort herunterreguliert (Pfaff et al. 2002, Maizels et al. 2004, Hartmann et al. 1997, Hartmann & Lucius 2003, Schierack et al. 2003). Zudem verhindert das *B. malayi*-Cystatin die antigene Peptid-Präsentation durch MHC-II (Manoury et al. 2001). Der Serin-Protease-Inhibitor (Serpin), der ebenfalls von *B. malayi*-Mikrofilarien produziert wird (Bm-SPN-2), blockt vermutlich die Neutrophilenprotease (Zang et al. 1999), ist aber auch für die IFNγ-Induktion durch die Mikrofilarien verantwortlich (Zang et al. 2000).

Somit wird die für Mikrofilarien schädliche IL-4- und IL-5-dominierte Immunantwort durch die IFNγ-Induktion ausgeglichen (Volkmann et al. 2003), die jedoch den Adultwürmern schadet (Saeftel et al. 2001).

Des Weiteren kommen bei Helminthen Glykane vor, die immunmodulatorisch wirken. Glykane von *B. malayi* induzieren eine T_H2-Immunantwort (Tawill et al. 2004), das phosphorylcholin-haltige Glykoprotein ES-62 von *A. viteae* inhibiert die TNFα-, IL-6-, IL-12- und IFNγ-Freisetzung durch Makrophagen und konnte auch bei einer LPS-ausgelösten rheumatoiden Arthritis die synoviale TNFα- und IL-6-Produktion hemmen (Goodridge et al. 2001, McInnes 2003).

Die inverse Korrelation der geographischen Verbreitung von Parasiten- und Autoimmunerkrankungen oder Allergien führte zur „Hygiene-Hypothese“ (Yazdanbakhsh et al. 2002, Guarner et al. 2006). Dabei wird vermutet, dass Mikroben das Immunsystem trainieren und zu viel Sterilität Immunerkrankungen hervorrufen können (Wickelgren 2004). Zusammen mit dem bekannten Potenzial der Helminthen, aktiv in die Immunantwort der Wirte einzugreifen, liegt die Vermutung nahe, dass Parasiten Autoimmunerkrankungen direkt beeinflussen können. In Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen konnten Parasiten, oder aber ihre exkretorischen/sekretorischen Stoffe bereits erfolgreich eingesetzt werden. Dazu gehört neben *A. viteae* mit dem bereits erwähnten ES-62 (McInnes 2003) auch *Schistosoma mansoni*, dessen Infektion das Auftreten von Typ 1-Diabetes in NOD (**N**on-**o**bese **d**iabetic)-Mäusen verhindert (Zaccone et al. 2003). Außerdem kann eine Behandlung mit *S. mansoni*-Eiern, die Schwere einer **e**xperimentellen **A**utoimmun**e**nzephalomyelitis (EAE) im Tiermodell für die Multiple Sklerose lindern (Sewell et al. 2003). Eine Infektion mit *Trichinella spiralis* verringert im Mausmodell die Entzündungsreaktionen bei der inflammatorischen Darmerkrankung (Khan et al. 2002), und Eier des Schweinepeitschenwurms *Trichuris suis* können sogar in humanen Patienten mit Morbus Crohn oder Ulzerativer Colitis die Krankheitserscheinungen wesentlich mildern (Summers et al. 2005 A, B).

Diese Veränderung der Reaktionslage hat auch Auswirkungen auf weitere Infektionen mit dem gleichen oder anderen Parasiten. Die Wechselwirkung bei gleichzeitiger Infektion mit zwei verschiedenen Parasiten (Co-Infektion) ist sehr unterschiedlich und im Einzelnen nicht ausreichend untersucht. Sie kann synergistisch oder auch antagonistisch sein, je nach Parasitenspezies oder vorhandener Reaktionslage. Der intestinale Helminth *Heligmosomoides polygyrus* führt z. B. bei Mäusen zu einem immunsuppressiven Phänotyp, wodurch normalerweise der von Mäusen schnell eliminierte Nematode *Nippostrongylus brasiliensis* chronisch werden kann (Colwell et al. 1973). Dem zweiten Nematoden wird seine Existenz also erleichtert.

Während adulte Helminthen T_H2-Immunantworten induzieren, rufen Infektionen mit Protozoen oder Bakterien protektive T_H1-Immunantworten hervor. So kommt es bei Co-Infektionen mit dem T_H2-induzierenden *H. polygyrus* und dem Bakterium *Citrobacter rodentium* zu einer drastisch veränderten Immunantwort, die durch eine erhöhte Pathologie und eine höhere Parasitenlast gekennzeichnet ist (Chen et al. 2005). Epidemiologische Untersuchungen ergaben, dass Helminthen-Co-Infektionen vor zerebraler Malaria schützen, aber gleichzeitig die Inzidenz der Malaria erhöhen können (Nacher et al. 2000, Spiegel et al. 2003). Im Mausmodell kann ebenfalls durch infektiöse Larven von *B. malayi* eine zerebrale Malaria durch *Plasmodium berghei* verhindert werden (Yan et al. 1997). Bei Mäusen mit einer *L. sigmodontis*-Infektion, die nicht patent geworden sind, d. h. eine T_H2-Antwort durch den Parasiten nicht erfolgreich induziert werden konnte, verschlimmern sich die Symptome einer *Plasmodium chabaudi*-Malaria (Graham et al. 2005). Das Auftreten der Läsionen einer *Leishmania major*-Infektion in Mäusen kann sowohl durch eine Co-Infektion mit *S. mansoni*, als auch mit *L. sigmodontis* verzögert werden (La Flamme et al. 2002, Lamb et al. 2005).

Anhand der Onchozerkose, die durch die humanpathogene Filarie *Onchocerca volvulus* ausgelöst wird, lässt sich ein solcher Zusammenhang der Modulation des Immunsystems mit den klinischen Manifestationen klar herstellen. Bei den meisten Infizierten werden die Mikrofilarien, die sich im Unterhautbindegewebe aufhalten, nur dann vom Immunsystem des Wirts erkannt, wenn sie degeneriert sind oder während des Absterbens (Wildenburg et al. 1996). Bei der hyperreaktiven Form der Onchozerkose, der Sowda, gibt es jedoch eine starke Antikörper-vermittelte Immunantwort gegen nicht-degenerierte Mikrofilarien, die dadurch in ihrer Anzahl reduziert werden. Allerdings geht dabei die Hautintegrität verloren (Körten et al. 1998), und die Patienten leiden unter starker Dermatitis und extremer Eosinophilie. Somit führt die vom Wirtsimmunsystem eingeleitete T_H1/T_H2-Immunantwort zwar zu einer Verringerung der Parasitenlast, jedoch auch zur Schädigung des Wirtsgewebes.

1.2 Sepsis

Helminthen induzieren im Allgemeinen eine T_H2-Immunantwort in ihren Wirten. Im Gegensatz dazu rufen Infektionen mit Bakterien eine T_H1-dominierende Immunreaktion hervor. Dabei stellt sich die Frage, ob die Immunsuppression durch die Helminthen eventuell auch eine überschiessende Immunreaktion, wie z. B. den Verlauf einer Sepsis, günstig verändern kann. Dabei muss sicherlich unterschieden werden zwischen einer künstlich durch LPS und einer durch vitale Bakterien ausgelösten Sepsis. Während sich die LPS-ausgelöste Sepsis dazu eignet, generelle anti-inflammatorische Mechanismen der Helminthen zu untersuchen, könnten diese bei Co-Infektion mit lebenden Bakterien deren Ausbreitung und die damit verbundene Pathologie fördern.

Die Sepsis ist einer der häufigsten Gründe für Komplikationen und Mortalität auf Intensivstationen. Meistens wird die Sepsis durch Infektionen mit gram-negativen Bakterien (ca. 60% der Fälle) ausgelöst, kann aber auch durch gram-positive Bakterien oder aber Pilze oder Viren erfolgen. Die Sepsis ist eine systemische Entzündungsreaktion auf Infektionen (SIRS, systemic **i**nflammatory **r**esponse **s**yndrom). Dabei kennzeichnen nach Meisner (2005) die frühe Sepsis zwei der folgenden SIRS-Kriterien, die aus Fieber oder Hypothermie, Leukozytose und Thrombozytopenie, Tachykardie und Tachypnoe bestehen. Die Letalität liegt dabei im frühen Sepsis-Stadium bei 5-20% (Meisner 2005). Die späte Sepsis wird von Verwirrtheit, Hypotonie, Oligurie und Organdysfunktion begleitet, wobei die Letalität bei 20% liegt (Meisner 2005). Beim septischen Schock kann schließlich eine Volumengabe die aufgetretene arterielle Hypotonie nicht mehr ausgleichen, wodurch die Letalität auf 50% ansteigt (Meisner 2005).

Die Erkennung gram-negativer Bakterien erfolgt durch den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), der das **L**ipo**p**oly**s**accharid (LPS) dieser Bakterien erkennt. Das LPS ist ein Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien, der für die Membranintegrität sorgt. Der toxische Bestandteil des LPS ist das Endotoxin, das am konservierten Phosphoglykolipid, dem Lipid A liegt (Freudenberg & Galanos 1990). Makrophagen entfernen LPS durch Scavanger-Rezeptoren (z. B. SR-A), die v. a. in der Leber exprimiert werden und somit die gram-negativen Bakterien aus dem Pfortaderblut entfernen. Des Weiteren entfernen Neutrophile gram-negative Bakterien durch das primary granule protein BPI (**b**actericidal **p**ermeability-**i**ncreasing protein), das LPS bindet und toxisch für die Bakterien ist (Elsbach & Weiss 1993). Das **L**PS-**b**inding **p**rotein (LBP) bringt zudem LPS zu freiem oder membrangebundenem CD14, das anschließend mit dem TLR4/MD2-Komplex auf der Phagozytenmembran interagiert (Kitchens & Thompson 2005).

Im Gegensatz zu gram-negativen Bakterien bilden gram-positive Bakterien kein Endotoxin (Majcherczyk et al. 1999). Die Zellwände der gram-positiven Bakterien enthalten hingegen Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, die an Zelloberflächen durch den TLR2 bzw. den TLR4 erkannt werden (Majcherczyk et al. 1999, Morath et al. 2001, Takeguchi & Akira 2001). Diese sind allerdings deutlich weniger proinflammatorisch als LPS, weshalb ihre Bedeutung bei der Sepsis ungewiß ist. Gram-positive Bakterien produzieren potente Exotoxine, die an MHCII und TCR-Vβ-Domänen binden und zu einer massiven T-Zell-Aktivierung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führen (Cohen 2002).

Weitere bakterielle Komponenten mit proinflammatorischer Aktivität sind Flagellin, das vom TLR5 erkannt wird (Smith et al. 2003), und unmethylierte CpG Sequenzen in nackter bakterieller DNA, die mit dem TLR9 interagieren (Bauer et al. 2001). Zudem wurden verschiedene **P**eptido**g**lykan-**r**ecognition-**P**roteine (PGRP), die zwischen gram-positiven und gram-negativen Bakterien unterscheiden können, gefunden, die in *Drosophila* Relish, ein Mitglied der NFκB-Familie, regulieren (Cohen 2002). NOD1 und NOD2, zwei intrazelluläre Proteine von Monozyten, binden ebenfalls LPS und vermitteln auch die Antwort auf LPS (Fritz et al. 2005).

Die Aktivierung des TLR führt zur Freisetzung von TNFα, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12, wodurch die Entzündungsantwort getriggert wird und weitere Phagozyten aktiviert werden. Eine exzessive, lange Stimulierung von Makrophagen unterstützt dabei durch die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren (TNFα, IL-1β und IL-6) die Entzündungsantwort. Zirkulierendes TNFα, IL-1, IL-6 und LPS korrelieren dabei direkt mit dem Ausgang der Sepsis (DeFranco et al. 2006). Die Zytokinproduktion im Blutstrom aktiviert die Endothelzellen. Die Aktivierung der Endothelzellen führt zur Expression von Adhäsionsmolekülen (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin) und der Aktivierung der Koagulationskaskade, was schließlich zur Organdysfunktion führen kann. Die Produktion von Chemokinen und Zytokinen durch die Endothelzellen verstärkt dabei die Entzündungskaskade und führt dazu, dass inflammatorische Zellen ins Gewebe einwandern. Zirkulierende Neutrophile werden nun aktiviert und adhärieren ans Endothel. Die systemische Aktivierung der Neutrophilen, die Proteasen und toxische Sauerstoffradikale produzieren, führt zu mikrovaskulären Schäden des Endothels und der interzellulären Gaps und erhöht dadurch die vaskuläre Permeabilität, wodurch der Blutdruck sinkt. Bei der späten Sepsis kommt es zur Neutrophilen Dysfunktion (geringere Chemotaxis, veränderte metabolische Funktionen von Superoxid oder H_2O_2), die sie ineffektiv gegen eindringende Organismen machen (Immunsuppression), aber immer noch systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen. Zudem ist das Komplementsystem an der Sepsis beteiligt.

Es erhöht die vaskuläre Permeabilität, lockt Leukozyten zum Entzündungsort, immobilisiert sie dort und erhöht die Phagozytose und Zell-Lyse. TNFα und IL-1 vermindern zudem direkt die Myokardial-Funktion. Beim refraktären Schock kommt es zum Auslaufen von Ödemflüssigkeit, was zu Organdefekten, v. a. der Organe mit großen Kapillaren wie Lunge oder Niere, und schließlich zum Tod führt.

Die Injektion von LPS führt zu einer Ausschüttung von TNFα, IL-6 und IL-8, die von Fieber, Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytopenie begleitet wird (DeFranco et al. 2006). Die Kinetik der Zellpopulationen und Zyto-/Chemokine der durch LPS-Injektion ausgelösten Sepsis im Menschen ist in Abb.1 dargestellt.

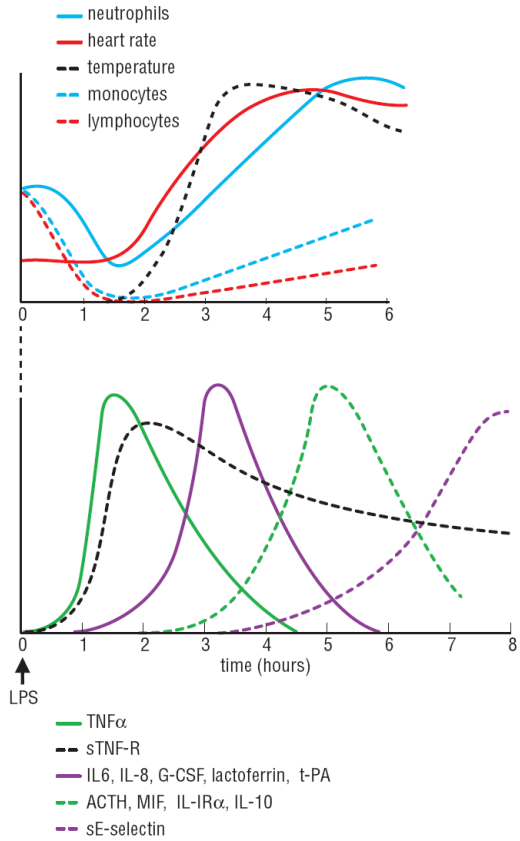


Abb.1: Kinetik der Zellpopulationen und der Zyto-/Chemokine nach Injektion von LPS im Menschen. Die TNFα-Konzentration steigt direkt nach der LPS-Injektion an und erreicht nach eineinhalb Stunden die Maximalwerte. Etwa drei Stunden nach der Injektion wird durch IL-6 die Akute-Phase-Antwort der Leber und der Glandula pituitaria (Hypophyse) iniziert, wobei IL-6 die Freisetzung von IL-1 und TNFα hemmt. IL-6, IL-8 und GCSF fördern die Aktivierung und Chemotaxis der Neutrophilen. Die Aktivierung der Neutrophilen führt zur Freisetzung von Lactoferrin aus Granula der Neutrophilen. Die Aktivierung der endothelialen Prokoagulantien findet ebenfalls drei Stunden nach der LPS-Injektion statt, was anhand des Anstiegs des t-PA (**t**issue **p**lasminogen **f**actor) gezeigt ist. Die von der Glandula pituitaria eingeleitete regulatorische und anti-inflammatorische Immunantwort durch ACTH (**A**dreno**c**orticot**r**ophes **H**ormon) und MIF (**m**igration **i**nhibition **f**actor) ist fünf Stunden nach der Injektion maximal und geht mit den Peaks der regulatorischen Zytokine IL-10 und IL-1Rα einher, die den profínflammatorischen Zytokinen entgegenwirken. Die Aktivierung des Endothels wird von erhöhten Werten des Adhäsionsmoleküls E-Selektin begleitet, die über mehrere Tage bestehen bleiben.

Verändert nach DeFranco et al. 2006.

1.3 Entwicklungszyklus von *Litomosoides sigmodontis*

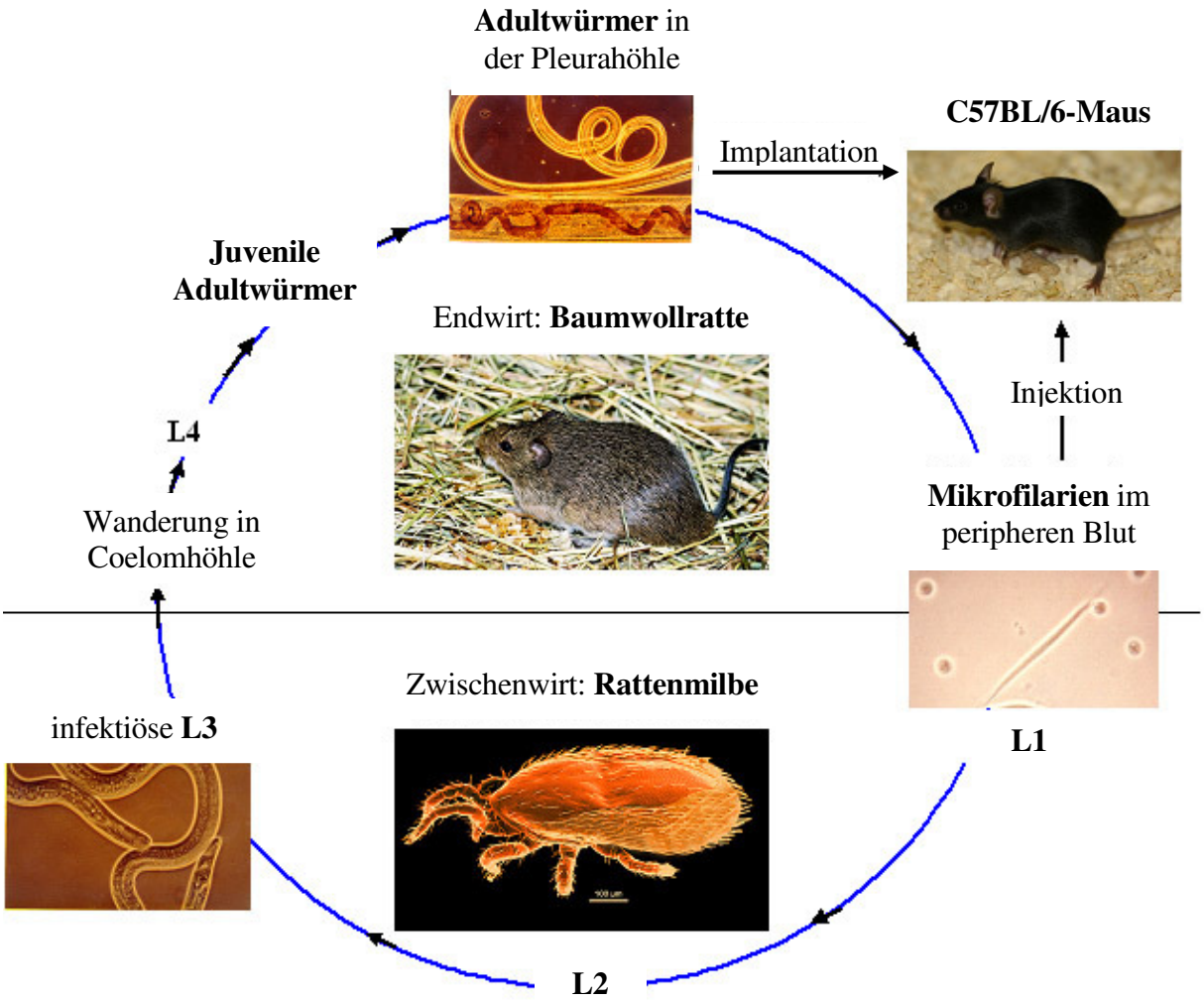


Abb.2: Entwicklungszyklus von *Litomosoides sigmodontis*. Verändert nach Hoffmann 2001 B.

Die in dieser Arbeit verwendete Filarie *L. sigmodontis* ist eng verwandt mit den humanpathogenen lymphatischen Filarien (Bain et al. 1994). Die adulten Filarien von *L. sigmodontis* leben in ihrem natürlichen Endwirt, der Baumwollratte *Sigmodon hispidus* in der Pleurahöhle (Abb.2). Ab dem 50. Tag nach der Infektion beginnen die adulten Filarienweibchen Mikrofilarien (erstes Larvenstadium, L1) freizusetzen, die in die Blutzirkulation eintreten. Der obligate Zwischenwirt, die tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti,* nimmt beim Blutsaugen an der infizierten Baumwollratte die Mikrofilarien auf, die sich 6-7 Tage nach der Infektion (d.p.i.) zur L2 häuten. Die Häutung zur infektiösen L3 findet 10-12 d.p.i. statt. Beim erneuten Blutsaugen überträgt die nun infektiöse Rattenmilbe die L3, welche 8-9 d.p.i. in die Coelomhöhle wandert und dort zur L4 wird (Renz & Wenk 1981). Die vierte Häutung zu den juvenilen Würmern, die nun in die Pleurahöhle wandern findet 22-28 d.p.i. statt.

In der Pleurahöhle kommt es zur Verpaarung (30 d.p.i.), wobei die Embryogenese 18 Tage dauert (Mössinger & Wenk 1986).
Das Geschlecht der adulten Würmer lässt sich leicht anhand des Größendimorphismus erkennen. Adulte Weibchen erreichen eine Länge von ca. 12-13 cm, wohingegen die Männchen nur ca. 3 cm lang werden.

1.4 Entwicklungszyklus von *Echinococcus multilocularis*

Der Fuchsbandwurm *E. multilocularis* kommt auf der gesamten nördlichen Hemisphäre vor, wobei die Fuchspopulationen in den Endemiegebieten wie Schweiz oder Schwäbische Alb zwischen 20-60% befallen sind. In Süddeutschland, Frankreich, Österreich und Schweiz sind jährlich zwischen 0,02 und 1,4 neue Fälle alveolärer Echinokokkose (AE) pro 100000 Einwohner zu verzeichnen (Gottstein 2000).
Der adulte Fuchsbandwurm *E. multilocularis* ist ein wenige Millimeter langer Cestod (Bandwurm), der im Dünndarm v. a. von Füchsen, aber auch von Katzen oder Hunden vorkommt (Abb.3). Als Zwischenwirte dienen Wühlmausartige (Familie Muridae, Unterfamilie Arvicolinae), in denen *E. multilocularis* als Metacestode vorliegt.
Beim Menschen führt die Infektion mit dem Metacestoden von *E. multilocularis* zur AE. Der Metacestode hat eine tumorartige, multivaskuläre Struktur, die infiltrativ in das umliegende Gewebe eindringt. Zudem schnürt der Metacestode durch exogene Knospung Vesikel ab, die das umliegende Gewebe infiltrieren (Eckert et al. 2000). Die Vesikel enthalten Keimanlagen, sogenannte Protoscolices, die bei der Aufnahme durch den Endwirt, wenn dieser eine infizierte Wühlmaus frisst, sich im Dünndarm des Endwirts evaginieren und zum adulten Wurm heranreifen. Etwa vier Wochen nach der Infektion des Endwirts schnüren die adulten Fuchsbandwürmer Proglottiden ab, die infektiöse Eier enthalten. Nach der oralen Aufnahme der Eier durch den Zwischenwirt wird im Darm die Onkosphäre freigesetzt. Durch die Darmwand wandert diese in die Blutbahn und gelangt an den bevorzugten Ansiedlungsort des Metacestoden, die Leber. Sekundär können andere Organe wie Lunge, Niere, ZNS u. a. befallen werden (Gottstein 1992).

Das tumorähnliche und infiltrative Wachstum des Metacestoden führt primär durch raumverdrängende Prozesse und durch die Zerstörung von vitalen Organstrukturen (z. B. Gallengänge oder Lebervenen) zu schweren Erkrankungen (Vuitton 2003). Unbehandelt führt die AE des Menschen zu einer Letalität von 94-100% (Schicker 1976; Wilson et al. 1992). Das Durchschnittsalter bei der Diagnose liegt bei etwa 50 Jahren. Der lange Zeitraum zwischen Infektion und Diagnose der AE macht in 20-40% der Fälle eine Operation mit radikaler Entfernung des Parasiten unmöglich. Die Therapie besteht neben der Resektion aus einer Langzeit-Chemotherapie mit Albendazol/Mebendazol (WHO 1996). Da die Chemotherapie jedoch nur parasitostatisch wirkt, muss sie lebenslang eingenommen werden (Ingold et al. 1999). Bei 80% der Fälle kommt es dadurch zu einer klinischen Besserung mit einer signifikanten Lebensverlängerung der Patienten.

Die Diagnose der AE erfolgt meist erst 5-15 Jahren nach der Infektion, nach zuvor unspezifischen Symptomen wie Oberbauchschmerzen, Gelbsucht oder aber durch Zufallsbefunde mittels bildgebender Verfahren wie Computertomographie oder Sonographie (Gottstein & Hemphill 1997). Für die Frühdiagnose der AE spielt die Immundiagnose mittels ELISA eine zentrale Rolle, durch die infizierte, symptomlose Patienten erfasst werden können. In den letzten Jahren wurden mehrere Antigene des Metacestoden entdeckt, die einen serologischen Nachweis von *E. multilocularis* ermöglichen (Gottstein 1992, Kern et al. 1994, Zhang et al. 2003).

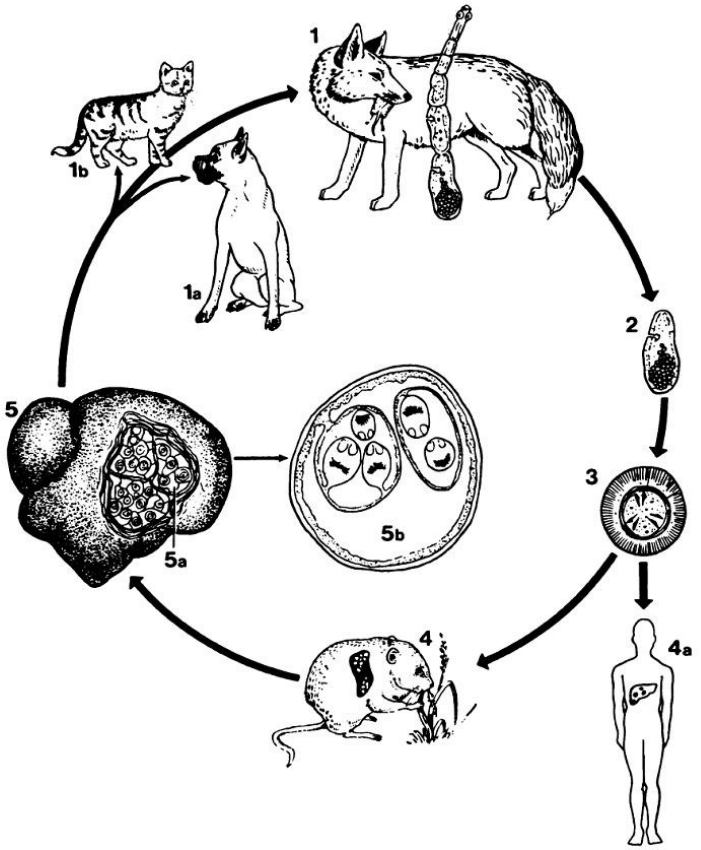


Abb.3: Entwicklungszyklus von *Echinococcus multilocularis*. Der Fuchs als bedeutendster Endwirt bei der alveolären Echinokokkose (1). Hund (1a) und Katze (1b), die ebenfalls von Adulten von *E. multilocularis* befallen sein können. Proglottide, die Fuchsbandwurm-Eier enthält (2). Fuchsbandwurm-Ei (3). Infektion des Menschen (4a) oder von Wühlmäusen (4) durch orale Aufnahme von Fuchsbandwurm-Eiern. Nagetier-Leber mit Metacestoden-Läsion (5). Querschnitt durch Leber mit Vesikeln, die Protoscolices enthalten (5a). Querschnitt eines Vesikels, mit äußerer Laminarschicht und innerer Keimschicht, von der sich Vesikel abschnüren (5b).
Abb. übernommen aus Gottstein 1992.

1.5 Immunologie bei der alveolären Echinokokkose

Epidemiologische und klinische Daten, wie z. B. die hohe Prävalenz von *E. multilocularis* in Füchsen in endemischen Gebieten, aber auch die geringe Inzidenz der AE in Menschen lassen vermuten, dass es nicht in allen Fällen zu einer klinischen Erkrankung kommt, da viele Personen abortive oder spontan geheilte Läsionen nach der Infektion zeigen (Gottstein & Felleisen 1995, Gottstein et al. 2001, Bresson-Hadni et al. 1994 A, Rausch et al. 1987).

Das progressive Wachstum des Parasiten führt zudem nicht zu einer fulminanten Entzündungsreaktion mit Organversagen im Menschen, sondern zu einer latenten, unauffälligen Erkrankung. Dies legt die Vermutung nahe, dass *E. multilocularis*, wie andere Helminthen

auch, die Immunantwort des Wirtes so beeinflusst, dass einerseits anti-parasitäre Immunantworten supprimiert, andererseits aber auch schädliche Entzündungsprozesse, die das Wirtsgewebe schädigen und eine Pathologie verursachen könnten, verringert werden (Hübner et al. 2006).

Dabei ist eine schweren AE mit einer generellen Immunsuppression assoziiert (Vuitton 2004, Emery et al. 1996), während T_H2-Immunantworten das Parasiten-Wachstum und den Krankheitsfortschritt begünstigen, und eine T_H1-Immunantwort mit starker Lymphozyten-Proliferation mit Protektion und abortiven AE-Läsionen verknüpft ist (Bresson-Hadni et al. 1989, Vuitton et al. 1989).

Das Zytokinprofil im Serum von AE-Patienten mit TNFα, IL-10, IL-12, IL-13 und sIL-2R korreliert somit mit dem aktuellen Krankheitsstatus (Godot et al. 2000, Shi et al. 2004, Dreweck et al. 1999, Kilwinski et al. 1998). Dabei konnte gezeigt werden (Hübner et al. 2006), dass PBMC (periphere Blut-mononukleäre Zellen) von AE-Patienten bei Co-Kultivierung von Metacestodenkulturüberstand (EmMed) oder Metacestodenkulturüberstand mit Vesikeln (EmVes) eine geringere Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-12 produzieren und dabei eine höhere Anzahl an $CD4^+CD25^+$-Zellen, möglicherweise regulatorischen T-Zellen, als PBMC von gesunden Blutspendern haben. Andererseits sind aber die Zahl aktivierter $CD4^+CD28^+$-Zellen und auch die IFNγ-Konzentration bei PBMC von AE-Patienten bei Co-Kultivierung mit Produkten des Metacestoden im Vergleich zu PBMC gesunder Blutspender signifikant erhöht.

E. multilocularis-Metacestoden und ihre sekretorischen/exkretorischen Produkte inhibieren und modulieren die zelluläre Immunantwort, indem sie Zytokinprofile polarisieren (Eger et al. 2003, Hübner et al. 2006), die Kapazität von Makrophagen, Antigene zu präsentieren, hemmen (Dixon 1997), und auch die Generierung von $CD4^+$-Gedächtniszellen stören (Manfras et al. 2004). Produkte des Metacestoden hemmen *in vitro* die IL-12-Ausschüttung von humanen PBMC (Hübner et al. 2006), und eine sekretorische Komponente des Metacestoden supprimiert die Proliferation von Milzzellen (Walker et al. 2004).

Auf diese Weise wird zum einen das Parasitenwachstum und die Verbreitung des Parasiten im Wirt begünstigt, zum anderen aber gleichzeitig eine Schädigung des Wirtes durch Entzündungsreaktionen vermieden, wodurch die meist unmerkliche Progression der Krankheit erfolgen kann.

1.6 Verwendung der Parasiten *L. sigmodontis* und *E. multilocularis*

Tiefere Einblicke in die Immunmodulation können von den hier verwendeten zwei systematisch sehr verschiedenen Parasiten, dem Nematoden *L. sigmodontis* und dem Cestoden *E. multilocularis,* gewonnen werden. So sind Mäuse bei *L. sigmodontis* Endwirt, während sie bei *E. multilocularis* Zwischenwirt sind. Des Weiteren sitzt *Litomosoides* als Adultwurm in der Pleurahöhle seiner Wirte und die Mikrofilarien zirkulieren im Blut bzw. sind im Lungenreservoir, während der *E. multilocularis* Metacestode sich infiltrativ vermehrt und Leber und anderen Organe befallen kann.

Die Nagetierfilarie *L. sigmodontis* dient als Modell für die lymphatischen Filariosen des Menschen (Bain et al. 1994). Humane Filarien können nicht im Tiermodell gehalten werden. So entwickelt sich *B. malayi* nur bis zur L3 in Labormäusen und wird nicht adult. Affen können zwar experimentell mit lymphatischen Filarien infiziert werden, sind aber als Versuchstiere für diese Fragestellung moralisch nicht vertretbar. Damit ist *L. sigmodontis*, dessen kompletter Zyklus im Labor unter standardisierten Bedingungen gehalten werden kann, das geeignete Modell, um Filariosen immunologisch und molekulargenetisch zu untersuchen (Petit et al. 1992, Hoffmann et al. 2000).

Sowohl die lymphatischen Filariosen, als auch die Infektion mit *E. multilocularis* führen zu jahre- bis jahrzehntelangen Infektionen, die normalerweise geprägt sind von einem unauffälligen Krankheitsbild. Somit eignen sich beide Parasiten hervorragend um die Mechanismen der Immunmodulation ihrer Wirte zu untersuchen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Seit langem ist bekannt, dass Helminthen die Immunantwort ihrer Wirte modulieren. Dadurch werden nicht nur Co-Infektionen beeinflusst, sondern auch überschießende oder fehlgeleitete Immunreaktionen des Wirtes, die dadurch gelindert oder sogar vermieden werden (Wickelgren 2004). In den letzten Jahren nahmen die Anstrengungen, dieses Potenzial der Helminthen weiter im Bezug auf Autoimmunerkrankungen und Allergien zu untersuchen, stark zu. Dabei blieb eine weitere Fehlfunktion des Immunsystems, die Sepsis, weitestgehend unbeachtet. Obgleich man zwischen einer natürlichen bakteriellen und einer künstlich mit LPS-ausgelösten Sepsis unterscheiden muss, so ist doch von Interesse, ob Infektionen mit Helminthen auch in der Lage sind, diese überschießenden Immunreaktionen zu hemmen.

Für diese Fragestellung sollte in Mäusen, die mit *E. multilocularis* infiziert sind, eine LPS-induzierte Sepsis ausgelöst werden. Da Filarien ebenfalls stark immunmodulatorisch wirken, sollten auch bei Infektionen mit *L. sigmodontis* der Einfluss auf eine LPS-induzierte Sepsis in

Mäusen untersucht werden. Die dadurch ausgelösten Immunreaktionen sollten anhand wichtiger T_H1- und T_H2-Zytokine im Blutplasma, der Veränderung der Körpertemperatur sowie der Überlebensrate charakterisiert werden und mit denen nicht infizierter Tiere verglichen werden. Eine genauere Betrachtung der LPS-induzierten Sepsis sollte an Tieren erfolgen, die Mikrofilarien injiziert bekommen hatten und bei denen zusätzlich das periphere Blutbild und weitere Zyto- und Chemokine untersucht werden sollten. Partiell immundefiziente knockout-Mausstämme sollten zudem den Einfluss einer zuvor erhaltenen Mikrofilarieninfektion auf eine akute Sepsis zeigen.
Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte ein Testverfahren etabliert werden, welches erlaubt, mögliche aktive Komponenten im *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand zu finden, die anti-inflammatorisch wirken. Dafür sollten zunächst die Eigenschaften des Metacestoden, die Immunantwort zu modulieren, untersucht werden. Neben den Sepsisversuchen in *E. multilocularis*-infizierten Mäusen sollten zusätzlich *in vitro* die exkretorischen/sekretorischen Komponenten des Metacestoden bei einer Kultivierung mit humanen PBMC auf mögliche immunmodulatorische Eigenschaften auf die Zytokinausschüttung im Zellkulturüberstand geprüft werden. Die Genomweite Messung der Genexpression von LPS-stimulierten PBMC, die mit Metacestodenkulturüberstand kultiviert wurden, sollte dabei weitere Einblicke geben.

Einblicke in die Immunmodulation von Helminthen können neue Konzepte zur Therapie von Autoimmunerkrankungen oder auch Allergien bringen. Dabei könnten anti-inflammatorische Substanzen von Parasiten eventuell auch akute inflammatorische Entzündungsreaktionen hemmen. Die Identifizierung von immunmodulatorischen Substanzen aus Parasiten hat dabei den Vorteil, dass diese Substanzen relativ gut vom Wirt vertragen werden. In der langen Evolution von Parasit-Wirt-Systemen adaptierten nämlich verschiedene Parasitenantigene hin zu einer besseren „Verträglichkeit“, was sich z. B. am Hirudin aus dem Blutegel eindrücklich zeigen lässt. Deshalb sollten keine Entzündungsreaktionen seitens des Wirtes entstehen. Die Verabreichung einer solchen Substanz hätte deutliche Vorteile im Vergleich zu Therapien bei denen ganze Parasiten eingesetzt werden. So wurden z. B. bei Patienten mit der Autoimmunerkrankung IBD (**I**nflammatory **B**owl **D**isease) oder Morbus Crohn die intakten Eier des Schweinepeitschenwurms *Trichuris suis* verabreicht (Wickelgren 2004, Summers et al. 2003 und 2005 B). Isolierte oder synthetisch hergestellte bzw. modifizierte Substanzen aus immunmodulatorisch kompetenten Helminthen hätten demgegenüber den Vorteil, dass mögliche pathologische Erscheinungen seitens der Parasiten verhindert, aber das positive Potential der Parasiten dennoch genutzt werden könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Blutspender

Für diese Arbeit wurden Blutproben von 72 gesunden Blutspendern verwendet, die in der Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen entnommen wurden. Dort wurde den Blutspendern 500 ml venöses Blut abgenommen, wobei für die hier durchgeführten Untersuchungen die Buffy Coat Zellen verwendet wurden.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 4-12 Wochen alte Mäuse aus konventioneller, offener Haltung. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen der Größen II und III auf Weichholzstreu gehalten. Nur immundefiziente Mäuse wurden in Käfigen gehalten, die in Einzelbelüftung mit gefilterter Luft versorgt wurden (IVC = Individually ventilated cages, System von Tecniplast, Hohenpeißenberg).

Die Haltung der Mäuse erfolgte bei 22°C Raumtemperatur und einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Wasser und extrudierte Alleinfutterpellets wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

C57BL/6

Die C57BL/6-Mäuse kamen ursprünglich von Harlan-Winkelmann und wurden am Institut für Tropenmedizin weitergezüchtet. Mäuse dieses Stammes sind resistent gegen Mikrofilarien der Nagetierfilarie *Litomosoides sigmodontis*, d. h. intravenös injizierte Mikrofilarien werden innerhalb von 6 Tagen aus dem peripheren Blut eliminiert (Pfaff et al. 2000 A).

DBA/1 und DBA/2

Die DBA/1 und DBA/2 Mäuse stammten ursprünglich von Harlan-Winkelmann. Während die DBA/1-Mäuse am Institut für Tropenmedizin weitergezüchtet wurden, stammten die in den Versuchen verwendeten DBA/2-Mäuse direkt vom Lieferanten. DBA/1 geht wie DBA/2 auf die Zucht von Little von 1909 zurück. Durch die bereits recht frühe Trennung dieser Stämme weisen sie einige genetische Unterschiede auf, unter anderem im MHC-*H-2*-Haplotyp, ansonsten haben sie einen ähnlichen genetischen Hintergrund. DBA/1- und DBA/2-Mäuse sind suszeptibel für *Echinococcus multilocularis*, wobei auch Protoscolices gebildet werden (Nakaya et al. 1997).

IL-10-ko

Die IL-10-ko-Mäuse (B6.129P2-*Il10tm1Cgn*$^{-/-}$) kamen vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen. Diese Mäuse besitzen den genetischen Hintergrund von C57BL/6 und sind nicht in der Lage IL-10 zu produzieren. Unter konventionellen Bedingungen neigen sie zu chronischer Enterocolitis und Anämie, unter pathogenfreien Bedingungen fallen die intestinalen Probleme weniger schwerwiegend aus. Die Lymphozytenentwicklung und Antikörperantworten sind im Vergleich zu Wildtypmäusen nicht verändert (Kuhn et al. 1993).

IFNγR-ko

Die IFNγR-ko-Mäuse (B6.129S7-*Ifngr1tm1Agt*$^{-/-}$) stammten vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen. Die Mäuse besitzen ebenfalls den genetischen Hintergrund von C57BL/6 und exprimieren bei homozygoter Ifngr1^{tm1}-Mutation keinen INFγ-Rezeptor 1. Die normale T-Zellantwort wird dadurch nicht beeinflusst, allerdings ist die innate Immunantwort gestört, was sich z. B. an einer gesteigerten Suszeptibilität für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* zeigt (Huang et al. 1993).

MARCO-ko

Ebenfalls vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen, wurden die MARCO (**ma**crophage **r**eceptor with **co**llagenous structure) ko-Mäuse (*C57BL/6-MARCO*$^{-/-}$) bezogen. Die MARCO-ko-Mäuse besitzen den genetischen Hintergrund von C57BL/6. MARCO ist ein Typ-II-Transmembranprotein aus der Klasse A-Scavengerrezeptorfamilie (Kraal et al. 2000), welches auf Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Mikrogliazellen vorkommt. MARCO bindet sowohl lebende wie auch durch Hitze abgetötete Bakterien. Als Liganden dienen u. a. bakterielle Lipopolysaccharide (Grolleau et al. 2003).

TNFR1-ko

Die TNFR1-ko-Mäuse (*C57BL/6-TNFRp55*$^{-/-}$) stammten vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen und wurden am Institut für Tropenmedizin weitergezüchtet. Die biologischen Aktivitäten des **T**umor**n**ekrose**f**aktors (TNF) werden über zwei Oberflächenrezeptoren mit Molekulargewichten von 55 bzw. 75 kDa (TNFR1 bzw. TNFRp55 und TNFR2 bzw. TNFRp75) vermittelt. Die hier eingesetzten Mäuse, die ebenfalls den genetischen Hintergrund von C57BL/6 haben, exprimieren kein TNFRp55 auf ihren Zellen. Der TNFRp75 wird hingegen unverändert exprimiert. Die Mutation beeinflusst weder die T-Zell-Entwicklung noch die Lymphozytenpopulationen. Insgesamt ist der TNF-Signalweg stark gehemmt, so dass kein NFκB in T-Zellen induziert werden kann. TNFRp55$^{-/-}$-Mäuse überleben

daher normalerweise letale Dosen von Lipopolysacchariden oder *Staphylococcus aureus*-Enterotoxin B. Infektionen mit *Listeria monocytogenes* enden bei TNFR1-ko-Mäuse letal, da sie die Infektion nicht kontrollieren können (Pfeffer *et al.* 1993; Bohn *et al.* 1998).

2.3 Narkotisierung und Markierung der Versuchstiere

Für kurzzeitige Eingriffe wie Blutabnahme, Markierungen am Ohr, i. p. oder i. m. Injektionen wurden die Mäuse in einen Exsikkator gegeben, der über eine Wasserstrahlpumpe mit einem Diethylether-Luftgemisch (Diethylether, Carl Roth, Karlsruhe) befüllt wurde. Etwa 10 s nachdem die Mäuse bewusstlos waren, wurden sie aus dem Exsikkator genommen. Die Tiere waren danach für ca. 1 min narkotisiert.

Für längere Eingriffe wie z. B. die Injektion von Mikrofilarien oder die Implantation von adulten Filarien, wurden die Mäuse erst kurzzeitig mit dem Diethylether-Luftgemisch betäubt, damit das Narkotikum, ein Gemisch aus Esketaminhydrochlorid (Ketanest®S) und Xylazinhydrochlorid (Rompun®), i. m. in den Oberschenkel des Hinterbeins der Maus gespritzt werden konnte. Bei Ketanest®S handelt es sich um ein dissoziatives Anästhetikum, welches zu Schmerzfreiheit, Bewusstseinsverlust und Amnäsie führt. Rompun® führt ebenfalls zu einem schlafähnlichen (sedativ-hypnotischen) Zustand, der jedoch mit einer allgemeinen Muskelrelaxation verbunden ist. Da Rompun® bei verschiedenen Tieren eine unterschiedlich stark ausgeprägte Schmerzfreiheit erzeugt, wurde es nur in Verbindung mit Ketanest®S verabreicht. Das injizierte Volumen betrug je nach Körpergewicht der Mäuse zwischen 45 und 60 µl und wurde mit einer 26 G Kanüle verabreicht. Diese Narkose hielt für etwa 1 h an.

Um die Versuchstiere innerhalb eines Käfigs voneinander unterscheiden zu können, wurden die Mäuse mit einer Lochzange am Ohr markiert.

2.4 Töten von Versuchstieren

Das Einschläfern der Tiere erfolgte mittels CO_2, welches langsam in eine luftdicht abgeschlossene Kunststoffbox, in welcher sich das Tier befand, eingebracht wurde, bis der Tod erfolgte.

2.5 Haltung des Parasiten *L. sigmodontis*

Als obligater Zwischenwirt der Nagetierfilarie *L. sigmodontis* diente die tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti* (Synonym: *Bdellonyssus bacoti*). Die Rattenmilben wurden in einem separaten Raum bei ca. 30°C und 80% relativer Luftfeuchtigkeit in Glasaquarien auf Streu gehalten. Damit die Rattenmilben nicht entkommen konnten, waren die Glasaquarien am oberen Rand mit einem, mit Insektenrepellent imprägnierten, Tuch umwickelt. Zusätzlich standen die Aquarien in großen Wannen, die mit Glycerin gefüllt waren.

Die Rattenmilben wurden zweimal wöchentlich mit narkotisierten (Nembutal®, Ceva, Paris, Frankreich) Mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*, Familie Muridae, Unterfamilie Gerbillinae (Rennmäuse)) gefüttert.

Zur Aufrechterhaltung des Zyklus von *L. sigmodontis*, wurden zu den Milben patent infizierte Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*, Familie Muridae, Unterfamilie Sigmodontidae (Neuweltmäuse)) oder Mongolische Rennmäuse gesetzt. Mit der Blutmahlzeit infizierten sich die Milben mit dem esrten Larvenstadium (L1). Um eine Übertragung der Milben auf die restlichen Tiere im Tierstall zu vermeiden, wurden die zur Infektion der Milben verwendeten Tiere in Gitterkäfige über den Milben-Aquarien gesetzt. So konnten keine neuen Milben an die Tiere gelangen und die noch an den Tieren haftenden Milben fielen nach der Blutmahlzeit wieder zurück in ihre Aquarien. Am nächsten Tag wurden die Mäuse zur Quarantäne in einen gesonderten Bereich des Tierstalls gebracht, wo sie für 2 Wochen blieben. Nach 8-9 Tagen hatten sich in den Rattenmilben die Mikrofilarien von *L. sigmodontis* zur infektiösen L3 weiterentwickelt.

Zur Infektion der Baumwollratten, dem natürlichen Endwirt von *L. sigmodontis*, aber auch von Mongolischen Rennmäusen, wurden diese zu den infektiösen Milben gesetzt und nach erfolgter Infektion wieder von ihnen getrennt.

Die Haltung der Baumwollratten und Mongolischen Rennmäuse erfolgte in Makrolonkäfigen des Typs III und IV, bei 22°C und geregeltem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus. Futter in Form von extrudierten Alleinfutterpellets und Wasser standen ihnen dabei uneingeschränkt zur Verfügung.

2.5.1 Isolierung von Mikrofilarien

Die Mikrofilarienisolierung erfolgte anhand einer Dichtegradientenzentrifugation nach Chandrashekar *et al*. (1984). Dafür wurde den Baumwollratten mit einer heparinisierten 60 µl-Hämatokritkapillare (Multimed, Kirchheim/Teck) durch Punktion des retro-orbitalen Venenplexus etwa 2 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in heparinisierten 12 ml Röhrchen mit Heparin-Natrium (Liquimin®N 2500, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyklin) aufgefangen und mit dem gleichen Volumen an Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin) vermischt.

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde zunächst aus Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und einer 2,5 M Saccharoselösung eine 90%ige isoosmotische Stammlösung hergestellt (9:1). Eine 30%ige Percolllösung wurde durch Mischen der Stammlösung im Verhältnis 1:3 mit 0,25 M Saccharoselösung erstellt, eine 25%ige Percolllösung durch ein Mischverhältnis von 3:7. Von der 30%igen Percolllösung wurden 2 ml in ein 12 ml Polystyrolröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) überführt. Mit einer Pasteurpipette wurde anschließend die 25%ige Saccharoselösung vorsichtig über die 30%ige Lösung geschichtet. Zuletzt wurden, ohne die Schichtung zu zerstören, 4 ml des verdünnten Blutes darüber geschichtet. Nach der Zentrifugation (35 min, 400 g, RT) waren die Mikrofilarien als weiße Bande zwischen Plasma und den Percolllösungen zu erkennen. Die Mikrofilarien wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen, in ein neues 12 ml Röhrchen überführt und mit Zellkulturmedium auf 10 ml aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation bei 400 g und RT für 10 min wurde der Überstand bis auf ca. 0,5 ml verworfen und das Pellet mit den Mikrofilarien in 1 oder 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert.

Für die Bestimmung der Mikrofilarien wurden 5 µl entnommen und 1:20 in Zellkulturmedium verdünnt. Ausgezählt wurde mikroskopisch mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer mit 0,2 mm Tiefe.

2.5.2 Mikrofilarieninfektion

Für die Mikrofilarieninfektion wurden 4-12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse aus offener Haltung verwendet, bzw. gleichalte immundefiziente Mäuse aus IVC Käfigen. Nach der Narkotisierung mit dem Rompun®-Ketanest®S-Gemisch wurden die Mäuse im Bereich der Vena jugularis desinfiziert (Softasept®, Braun, Melsungen) und mit Klebestreifen auf einer Plastikunterlage fixiert. Mit einem kleinen Schnitt von ca. 1 cm Länge wurde die Vena jugularis freigelegt und in diese 50000 Mikrofilarien mit einer 100 µl Spritze der Stärke 30 G injiziert. Die Verabreichung der Mikrofilarien wurde dabei unter dem Binokular verfolgt. Das verabreichte Volumen betrug 20-50 µl. Als Kontrolle für die Operation wurde zusätzlichen Tieren dasselbe Volumen an Zellkulturmedium ohne Mikrofilarien injiziert. Die Schnittwunde wurde nach der Injektion durch Zusammenpressen der Wundränder geschlossen. Nach der Operation wurden die Mäuse für vier Tage in Käfige mit Zellstoff gesetzt, um Entzündungen über das Streu zu vermeiden. Damit die Mäuse nicht auskühlten, wurden sie nach der Operation bis zum Aufwachen in einem Brutschrank (B5090 E, Heraeus, Hanau) bei 27°C untergebracht. Die Mikrofilariendichte wurde 1-2 h nach der Operation bestimmt.

2.5.3 Quantifizierung der Mikrofilarien

Zur Bestimmung der Mikrofilariendichte wurde den Mäusen retro-orbital mit einer Hämatokritkapillare (Minicaps, heparinisiert, 10 µl, Multimed, Kirchheim/Teck) Blut entnommen. 30 µl des Blutes wurden zu 1 ml FACS-Lysing-Solution (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) pipettiert und anschließend auf einem Vortex kurz gemischt. Zum Lysieren der Zellen wurden die Proben mindestens 5 min stehen gelassen, wonach sie bei 400 g für 5 min bei RT zentrifugiert wurden. Für das Auszählen der Mikrofilarien wurde der Überstand bis auf ca. 15 µl mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und der Rest resuspendiert, auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckgläschen versehen. Am Mikroskop wurde schließlich die gesamte Fläche unter dem Deckgläschen auf Mikrofilarien hin ausgezählt, welches die Anzahl der Mikrofilarien pro 30 µl Blut ergab.

2.5.4 Gewinnung von adulten Filarien

Adulte Filarien wurden aus der Pleura von Rennmäusen bzw. Baumwollratten isoliert. Dafür wurden die infizierten Mäuse mittels CO_2 eingeschläfert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde anschließend die Maus dorsal auf ein Styroporbett fixiert und mit desinfiziertem Besteck V-förmig vom Unterleib beginnend bis über den Brustkorb geöffnet. Mit einem Einschnitt unterhalb des letzten Rippenbogens wurde das Diaphragma gelöst und eine kleine Öffnung in die Pleurahöhle geschaffen. Mit einer, zu einem Haken geformten, Pasteurpipette aus Glas konnten nun die Filarien herausgezogen und in eine separate Petrischale mit Zellkulturmedium gegeben werden. Zudem wurde die Pleurahöhle mit einer Pasteurpipette mit Zellkulturmedium ausgewaschen, wodurch weitere Filarien gewonnen werden konnten. Bei starkem Befall der Mäuse kamen Filarien auch im Peritoneum vor.
Die Filarien wurden anschließend in 48-Well Platten voneinander getrennt, auf Vitalität geprüft und nach Geschlecht sortiert. Bis zur Implantation, die noch am selben Tag erfolgte, wurden die isolierten Filarien im Brutschrank (BBD6220, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO_2 und 90%iger Luftfeuchtigkeit gelagert.

2.5.5 Implantation von adulten Filarien

Für die Implantation wurden 4-12 Wochen alte C57BL/6-Mäuse aus offener Haltung verwendet, bzw. gleichalte immundefiziente Mäuse aus IVC Käfigen. Diese wurden im Diethylether-Luftgemisch betäubt und anschließend mit einer Rompun®-Ketanest®S-Injektion für ca. 1 h narkotisiert. Mit zwei kleinen Schnitten wurde erst die Bauchhaut, dann das Peritoneum freigelegt. Mit einer Pasteurpipette wurden fünf adulte Filarien zusammen mit Zellkulturmedium aufgenommen und in das Peritoneum implantiert. Getrennte Experimente wurden mit adulten weiblichen Filarien aus präpatent-, patent- und postpatent-infizierten Tieren, aber auch mit männlichen adulten Filarien durchgeführt. Anschließend wurde erst die Bauchhaut, dann der Hautschnitt mit Rückstich doppelt vernäht (Vicryl 5/0, geflochten, Ethicon, Edinburgh, Schottland). Als Kontrolle für die Operation wurden Mäuse nur mit Zellkulturmedium scheininfiziert. Nach der Operation wurden die Mäuse für 4 Tage in Käfige mit Zellstoff gesetzt, um Entzündungen über das Streu zu vermeiden. Um ein Auskühlen der Mäuse zu verhindern, wurden sie zudem nach der Operation bis zum Aufwachen in einem Brutschrank bei 27°C gehalten.

2.6 Zyklushaltung von *Echinococcus multilocularis*

Der Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* wurde nur als Metacestodenstadium *in vivo* und *in vitro* gehalten. Die Aufrechterhaltung des gesamten Zyklus, der den Fuchs als Endwirt einschließen würde, ist aufgrund der Infektionsgefahr für den Menschen, am Institut für Tropenmedizin, Tübingen, nicht praktiziert worden. Da der Mensch Zwischenwirt bei dieser Parasitose ist und somit vom Metacestodenstadium befallen wird, ist der komplette Zyklus für die Fragestellungen, die die Auswirkungen einer Infektion im Menschen betreffen, nicht nötig. Zur Aufrechterhaltung des Parasitenzyklus wurde aus infizierten Zwischenwirten, den Rennmäusen *Meriones unguiculatus* bzw. *Gerbillus perpallidus* (Familie Muridae, Unterfamilie Gerbillinae) das Metacestodengewebe isoliert und durch Injektion in neue Zwischenwirte übertragen. Ein Teil des Metacestodengewebes wurde dabei in Kultur genommen.

2.6.1 Isolierung von Metacestodengewebe

Zur Isolierung des Metacestodengewebes wurden die infizierten Rennmäuse durch CO_2 getötet und in 70%igem Ethanol desinfiziert. Die folgenden Schritte erfolgten unter der Sterilbank (Hera Safe, Heraeus, Hanau). Die infizierte Rennmaus wurde dorsal auf ein Styroporbett fixiert. Mit einem geraden Schnitt vom Unterleib ausgehend bis oberhalb des Brustkorbes wurde die Bauchhaut freigelegt und seitlich mit Nadeln im Styroporbett fixiert. Ein weiterer gerader Schnitt legte anschließend das Peritoneum frei. Der Metacestode war vorwiegend im gesamten Bauchraum vorzufinden, durchzog aber auch stets die Leber. Das Metacestodengewebe wurde nun freipräpariert, in ca. 3 cm große Blöcke geschnitten und mit Medium-AB gewaschen. Anschließend wurden Reste vom Wirtsgewebe mit der Schere vom Metacestoden-Block entfernt und der Waschschritt wiederholt.

2.6.2 Metacestodenkultur

Zur *in vitro* Kultur wurde ein frisch isolierter Metacestoden-Block in eine 75 cm^2 Gewebekulturflasche (Costar® Non-Pyrogenic, Polystyrene, Corning, NY, USA) überführt und mit Medium-FBS-AB auf ca. 100-150 ml aufgefüllt. Abb.4 zeigt einen solchen Metacestoden in der *in vitro* Kultur. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Cellstar, Nunc, Wiesbaden). In der ersten Woche wurde bei den neu angesetzten Metacestodenkulturen alle 2 Tage das Medium FCS AB durch Dekantieren vollständig gewechselt. Danach erfolgte der Wechsel des Medium FCS AB einmal wöchentlich. Dabei wurden die Metacestodenkulturüberstände in einer sterilen, leeren Zellkulturflasche gesammelt und für einige Minuten stehen gelassen, damit sich die Vesikel absetzen konnten.

Anschließend wurde der EmMed entweder verworfen, oder aber bis zur weiteren Verwendung am selben Tag, z. B. als Stimulierung für PBMC, im 50 ml Gefäß (PP Test tube, Greiner Bio-One, Frickenhausen) in den Brutschrank gestellt. Die sich am Boden abgesetzten Vesikel wurden ebenfalls in einem 50 ml Gefäß bis zur Weiterverwendung im Brutschrank gelagert, bzw. zur späteren Antigengewinnung bei -20°C tiefgefroren. Die Kultivierung der Metacestoden wurde bei guter Vesikelproduktion bis zu einem Jahr durchgeführt.

Abb.4: *E. multilocularis* Metacestode *in vitro* mit sich abschnürenden Vesikeln.

2.6.3 Kultivierung in serum- bzw. proteinfreien Medien

Um die Identifizierung von *in vitro* exkretierten/sekretierten Produkten vom Metacestodengewebe zu erleichtern, wurden die Metacestoden in serum- bzw. proteinfreien Medien kultiviert. Dafür wurde Medium mit Serumersatz (SES Medium), serumfreies X-Vivo 15 (Bio Whittaker, Walkersville, MA, USA) sowie ebenfalls serumfreies CD Hybridoma Medium verwendet. Die Kultivierungsbedingungen und die Medienwechsel stimmten mit den konventionell *in vitro* gehaltenen Metacestoden überein.

2.6.4 Infektion von Rennmäuse

Für die Infektion von Rennmäusen wurde frisch isoliertes Metacestodengewebe zunächst vom restlichen Wirtsgewebe befreit und mit Zellkulturmedium gewaschen. Anschließend wurde das Metacestodengewebe mit einer Schere grob zerkleinert und mit dem Stempel einer sterilen Spritze durch ein feines Metallsieb gepresst. Mit etwas Zellkulturmedium wurde das zerkleinerte Metacestodengewebe mit einer 18 G x 1½ (1,2 mm x 40 mm) Kanüle in eine 2 oder 5 ml Spritze aufgenommen. Nachdem die Suspension unter dem Mikroskop auf Protoscolices hin untersucht wurde, wurden zwischen 0,5 und 1 ml der Metacestodensuspension i. p. in *M. unguiculatus* bzw. *G. perpallidus* injiziert. Hierfür wurden die Tiere kurzzeitig im Diethylether-Luftgemisch narkotisiert. Mit Metacestoden infizierte Tiere überlebten etwa ein halbes Jahr.

2.6.5 Infektion von DBA/1- und DBA/2-Mäusen

Die Injektion der Metacestodensuspension erfolgte i. p. nach Betäubung der Mäuse im Diethylether-Luftgemisch. Pro Maus wurden 0,5 ml der Metacestodensuspension, die 20000 Protoscolices enthielt, i. p. injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das gleiche Volumen an Medium i. p. verabreicht.

2.7 Injektion von LPS

Um eine systemische Entzündungsreaktion hervorzurufen, wurde den Mäusen eine subletale Dosis von 4 µg/g Körpergewicht *E. coli* (026:B6) LPS i. p. gespritzt. Hierfür wurden die Mäuse kurzzeitig mit einem Diethylether-Luftgemisch narkotisiert, gewogen und danach i. p. gespritzt. Als Kontrolle wurde steriles PBS i. p. verabreicht. Die LPS-Gabe erfolgte 10-14 Tage nach der Implantation der adulten Filarien, bzw. einen Tag nach der Mikrofilarieninfektion. Da die LPS-Gabe bei den Tieren zu einer Temperaturabnahme führt, wurden die Tiere ü. N. im Brutschrank bei 27°C gehalten. Das Überleben der Tiere wurde über 48 h nach der LPS-Injektion verfolgt.

2.8 Temperaturmessung

Die Messung der Temperatur bei den Mäusen erfolgte rektal. Für die Messung wurden die Tiere kurzzeitig mit einem Diethylether-Luftgemisch betäubt. Anschließend wurde ein Temperaturfühler (Digitalthermometer GTH 1170, Gresinger electronic GmbH, Regenstauf) mit einer Hautschutzsalbe (Silicoderm®-F, Bayer Leverkusen, Leverkusen) eingecremt, bevor er rektal eingeführt wurde.

2.9 Plasmagewinnung

Den Mäusen wurden nach einer Diethylether-Luftgemisch-Narkose 20 Tropfen Blut (ca. 300 µl) retro-orbital abgenommen und in Plasmaröhrchen (BD Microtainer, Franklin Lakes, NJ, USA) überführt. Nach 10-maligem Invertieren wurden die Proben für 2 min bei 15000 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C tiefgefroren.

2.10 Zytokin-, Chemokin- und Antikörperbestimmung

2.10.1 ELISA zur Bestimmung muriner Zytokine

Die Zytokine wurden im Plasma mittels ELISA nach Herstellerangaben quantitativ bestimmt (OptEIA^{TM} Set Mouse, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Verwendet wurde das Sandwich-Verfahren, bei dem das gesuchte Zytokin von Antikörpern gebunden wird, die an einer ELISA-Platte mit ihrem Fc-Teil fixiert sind. Ein zweiter biotinylierter Antikörper bindet nun an das bereits gebundene Zytokin. Die Zugabe der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase führt dazu, dass es zu einer Signalverstärkung kommt. Streptavidin hat eine hohe Affinität zu Biotin, und die gekoppelte Meerrettich-Peroxidase führt zu einem Farbumschlag bei Zugabe des Substrats TMB.

Die Tab.1 zeigt die gemessenen Zytokine, sowie die verwendeten Verdünnungen der Antikörper. Der TGFβ Zytokin-ELISA, der sowohl für humane, als auch für murine Proben verwendet werden kann, wurde wie in Kapitel 2.10.3 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden 96-Well EIA/RIA Mikrotiterplatten (96-A/2-Well, Costar, NY, USA) mit dem ersten Antikörper beschichtet. Der erste Antikörper wurde hierfür entweder in einem 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer pH 6,5 (IL-10, IL-12 und TNFα) oder einem 0,1 M Natrium Carbonatpuffer pH 9,5 (IL-6, IFNγ und TNFR2) verdünnt. Die Platten wurden mit Tesafilm als Verdunstungsschutz verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Flüssigkeit aus den Platten dekantiert und die Platten mit dem Waschpuffer (1xPBS inkl. 0,005% Tween) viermal mit Hilfe eines Waschkammes, der an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, gewaschen. Anschließend wurden 150 µl/Well Assay Diluent (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) hinzugegeben und die Platten für 1 Stunde bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem viermaligen Waschen wurden die Platten mit den gegebenenfalls in Assay Diluent verdünnten Plasmen und den Standardreihen versehen und für weitere 2 h bei RT inkubiert. Im Anschluß folgten 5 weitere Waschschritte, nach denen der biotinylierte Anti-Maus-Detektions-Antikörper zusammen mit dem Avidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat zugegeben wurde. Nach siebenmaligem Waschen wurde der Platte das TMB-Substrat zugegeben. Gestoppt wurde die Reaktion nach erfolgtem Farbumschlag mit 1 N H_2SO_4 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Messung der optischen Dichte erfolgte an dem EL_X808 ELISA-Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA) bei 450 nm und einem Referenzfilter von 650 nm. Anhand der Standardkurve konnte anschließend die Konzentration des gemessenen Zytokins im Plasma ermittelt werden.

Zytokin-Kit	1. Antikörper	2. Antikörper	Avidin-HRP-Konjugat
BD OptEIA™ Set Mouse **IL-6**	1:250	1:250	1:250
BD OptEIA™ Set Mouse **IL-10**	1:250	1:250	1:250
BD OptEIA™ Set Mouse **IL-12 (p40)**	1:250	1:250	1:250
BD OptEIA™ Set Mouse **IFN-γ** (AN-18)	1:250	1:500	1:250
Human **TGF-β** CytoSet™ (Biosource)	1:125 (4 µg/ml)	1:625 (0,64 µg/ml)	1:1750
BD OptEIA™ Set Mouse **TNF** (mono/mono)	1:250	1:250	1:250
BD OptEIA™ Set Mouse **TNF RII**	1:250	1:500	1:250

Tab.1: Verwendete Zytokin-Kits sowie die Angabe der Verdünnungen für die ersten und zweiten Antikörper. In Klammern sind die bekannten, eingesetzten Konzentrationen angegeben. Die letzte Spalte zeigt die erforderliche Verdünnung des Avidin-Meerrettich-Peroxidase(HRP)-Konjugats.

2.10.2 Zytokin/Chemokin-Bestimmung mittels Luminex

Als zusätzliche Methode zur Bestimmung bestimmter Zytokine und Chemokine, wurde der Mouse Cytokine Twenty-Plex Kit (Luminex, Biosource, Camarillo, CA, USA) verwendet. Der Twenty-Plex Kit wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Luminex-Messung wurden 50 µl Plasma auf Trockeneis an das German Research Centre for Biotechnology der GBF, Braunschweig, geschickt. Die Methode basiert auf einer Kombination von ELISA und der Durchflußzytometrie. Dabei werden 5,6 µm große Polystyren-Beads verwendet, die mit 2 Farbstoffen gefärbt sind und durch unterschiedliche Farbkonzentrationen unterschieden werden können. An den Beads sind die für das Zytokin oder Chemokin spezifischen Antikörper gekoppelt, die bei der Inkubation mit der Probe diese binden. Die Zugabe von einem Biotin-markierten zweiten Antikörper, der dann wie beim ELISA mit Streptavidin-PE reagiert, führt dann zu einer Signalverstärkung, die gemessen werden kann.

Für die Messung wurden die Proben 1:3 verdünnt und mit den Beads inkubiert. Standardreihen der gemessenen Zytokine und Chemokine dienten der späteren Quantifizierung der Zytokin-/Chemokinkonzentrationen. Nicht gebundene Proteine wurden anschließend durch Waschschritte entfernt. In einer zweiten Inkubationsphase wurde der zweite Antikörper hinzugegeben. Im Anschluss fand ein weiterer Waschschritt statt, nachdem Streptavidin-PE zugefügt und der Versuchsansatz erneut inkubiert wurde. Im folgenden Waschschritt wurde das überschüssige Streptavidin entfernt und die Messung am BioPlex Reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Anhand zweier Laser wurden zum einen die Integrität der Beads und deren Farbcodierung festgestellt, zudem wurde auch über die Größe der Beads ermittelt, ob mehrere Beads ein Konglomerat gebildet hatten, die dann von der Messung ausgeschlossen wurden. Zum anderen wurde mit dem zweiten Laser Streptavidin-PE detektiert und dessen mittlere Fluoreszenzintensität berechnet. Pro Messung wurden 100 Beads einer Sorte ausgewertet.
Eine Übersicht über die gemessenen Zytokine und Chemokine gibt die Tab.2 wieder.

IL-1α	IL-6	IFNγ - Interferon γ	KC - Keratinocyte chemokine
IL-1β	IL-10	TNFα - Tumor necrose factor α	MCP-1 - Monocyte chemoattractant protein 1
IL-2	IL-12p40/p70	FGF - Fibroblast growth factor	MIG - Monokine induced by gamma-interferon
IL-4	IL-13	GMCSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	MIP-1α - Macrophage inflammatory protein-1 α
IL-5	IL-17	IP-10 - IFN-inducible protein 10	VEGF - Vascular endothelial growth factor

Tab.2: Übersicht über die im Twenty-Plex gemessenen Zytokine und Chemokine.

2.10.3 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand humaner Zellen

Die Bestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand humaner PBMC erfolgte mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), nach dem Sandwich-Verfahren (s. Kap.2.10.1).
Die Durchführung des ELISA wurde nach Herstellerangaben (Human CytoSets™, bzw. Human Flexia™ 10-Palte Format, Biosource, Camarillo, CA, USA) vorgenommen. Die Tab.3 zeigt die gemessenen Zytokine und die eingesetzten Konzentrationen und Verdünnungen der Antikörper und des Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Konjugats.

Zunächst wurde eine EIA/RIA Platte mit 50 µl des ersten Antikörpers beschichtet. Der erste Antikörper wurde dafür auf die richtige Konzentration in 1xPBS verdünnt. Die Platte wurde mit Tesafilm verschlossen und bei 4°C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung dekantiert und mögliche freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation bei RT mit 150 µl PBS/BSA pro Well geblockt. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder abgekippt und die Platte mit einem Waschkamm über eine Wasserstrahlpumpe viermal mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss konnten die Standards und Zellkulturüberstände hinzugegeben werden. Eingesetzt wurden jeweils 35 µl, wobei mindestens immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Von den Zytokinstandards wurde durch 1:2 Verdünnungen in PBS BSA Verdünnungsreihen angefertigt, durch die eine spätere Quantifizierung der Zytokinmenge in den Zellkulturüberständen möglich war. Falls die Zytokinkonzentrationen der Proben oberhalb der Standardreihe lagen, wurden die Proben mit PBS BSA so verdünnt, dass sie im Standardbereich lagen. Zu den Proben und Standards konnten sofort je Well 15 µl des zweiten biotinylierten Antikörpers gegeben werden, der ebenfalls in PBS BSA auf die richtige Endkonzentration eingestellt wurde.

Für die Bestimmung von TGFβ im Zellkulturüberstand musste der Zellkulturüberstand direkt vor der Messung zunächst mit 1 N HCl behandelt werden (2 µl 1N HCl zu 50 µl Überstand). Die angesäuerten Proben wurden für 15 min bei RT inkubiert, wonach die Proben mit 1 N NaOH (1,5 µl) wieder neutralisiert wurden. 50 µl des behandelten Zellkulturüberstandes wurden für den TGFβ ELISA mit 25 µl des zweiten Antikörpers pro Well auf die Platte gegeben.

Die Inkubation bei allen ELISA erfolgte bei RT, wobei die Platte dabei konstant geschüttelt wurde. Nach 2 h wurde die Flüssigkeit wieder aus der Platte durch Dekantieren entfernt und die Platte fünfmal gewaschen. Bei den Flexia™ Kits, die für IL-10 und IFNγ verwendet wurden, waren die zweiten Antikörper bereits HRP-markiert, weshalb bei ihnen der nachfolgende Schritt entfiel. Bei den CytoSet Kits wurden 50 µl der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (in PBS BSA) in jedes Well pipettiert, wobei die Inkubationsdauer 45 min bei RT betrug. Im Anschluss wurde die Platte durch Dekantieren geleert und sechsmal gewaschen. Die Zugabe des Substrats TMB führte zum Farbumschlag, der je nach Intensität nach spätestens 30 min durch die Zugabe von 1 N H_2SO_4 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) beendet wurde. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 450 nm und einem Referenzfilter von 650 nm mit einem EL_X808 ELISA-Reader (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA). Die Quantifizierung der Zytokinmenge im Zellkulturüberstand erfolgte anhand der Standardkurve.

Zytokin-Kit (Biosource)	1. Antikörper	2. Antikörper	Streptavidin-HRP
Human **IL-1 β** CytoSets™	1 µg/ml (1:1000)	0,4 µg/ml (1:1250)	1:1250
Human **IL-10** Flexia™	5 µg/ml (1:200)	1:11 (HRP-markiert)	-
Human **IL-12+p40** CytoSets™	1 µg/ml (1:1000)	0,16 µg/ml (1:1250)	1:2500
Human **IFN-γ** Flexia™	10 µg/ml (1:100)	1:11 (HRP-markiert)	-
Human **TGF-β** CytoSet™	4 µg/ml (1:125)	0,64 µg/ml (1:625)	1:1750
Human **TNF-α** CytoSets™	4 µg/ml (1:500)	0,32 µg/ml (1:625)	1:1250

Tab.3: Konzentrationen für die eingesetzten ersten und zweiten Antikörper und deren erforderliche Verdünnung (in Klammern angegeben) für die jeweiligen Zytokine. Die letzte Spalte zeigt die erforderliche Verdünnung der Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Für die Zytokine IL-10 und IFNγ wurden Flexia™-Kits verwendet, bei denen bereits der zweite Antikörper mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) markiert ist.

2.10.4 Antikörperbestimmung

Die Antikörper wurden zusammen mit der Zellanalyse (Kap. 2.11) an der German Mouse Clinic der GSF, Neuherberg, bestimmt. Für die Bestimmung der Antikörper im peripheren Blut der Mäuse wurden 0,5 ml Blut retro-orbital entnommen und mit 10 µl Heparin-Natrium (Liquemin® N 5000, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) versehen und verschickt. Die Blutproben wurden am Folgetag analysiert.

Die Quantifizierung der unspezifischen Antikörper IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA im Plasma wurde für alle Antikörper mittels eines Bioplex-Bead-Assays von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) durchgeführt. Hierbei werden monoklonale Antikörper verwendet, die an Beads unterschiedlicher Farben konjugiert sind, wodurch sich simultan die genannten Immunglobuline in einer Probe messen lassen. Die Bestimmung der Immunglobulin-Konzentrationen erfolgt dann in einem Bioplex-Reader.

2.11 Zellanalyse mittels FACS

Die Bestimmung der Zellpopulationen im peripheren Blut der Mäuse erfolgte gemeinsam mit der Antikörperanalyse (Kap. 2.10.4). Die heparinisierten Blutproben wurden an die German Mouse Clinic der GSF, Neuherberg, zur FACS-Analyse geschickt, die am nächsten Tag stattfand.

Dort wurde zunächst zur Isolierung der Leukozyten direkt in 96-Well-Mikrotiterplatten eine Erythrozytenlyse mittels 0,17 M NH_4Cl-Trispuffer (pH 7,45) durchgeführt. Nach einem Waschschritt mit FACS-Färbepuffer (PBS, 0,5% BSA, 0,02% Natriumazid, pH 7,45) wurden die Leukozyten 20 min mit einem anti-Fc-Rezeptor-Antikörper (Klon 2.4G2, PharMingen, San Diego, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gefärbt (PharMingen). Nach der Inkubation mit den Antikörpern wurde Propidiumjodid zur Identifizierung toter Zellen zugefügt. Eine Übersicht über alle durchgeführten Färbungen gibt Tab.4.

Die Analyse der gefärbten Zellsuspensionen erfolgte in einem Cyan-Durchflusszytometer (DakoCytomation, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), wobei immer 25000 Zellen gezählt wurden. Die Daten wurden anschließend mit der Software FlowJo (TreeStar Inc., USA) ausgewertet. Neben dem prozentualen Anteil der jeweiligen Zellpopulationen wurden zudem geometrische Mittelwerte der Fluoreszenzintensität angegeben, die ein gewisses Maß für die Anzahl der CD Moleküle auf der Zelloberfläche darstellen.

Oberflächenmarker	**Zelltyp**	**Klon**
$CD3^+$	T-Zellen	145-2C11
$CD4^+$	T_H	RM4-5
$CD4^+CD25^+$ (= IL2rα)	$T_{regulatorisch}$	RM4-5; PC61
$CD4^+$CD62L high (= L-Selektin)	naive T_H	RM4-5; MEL-14
$CD4^+$CD62L low	Memory-/Effektor- oder aktivierte T_H	RM4-5; MEL-14
$CD4^+Ly6c^+CD44$-	Memory-/Effektor- oder aktivierte T_H	RM4-5; AL-21; IM7
$CD4^+Ly6c^+CD44^+$	Memory-/Effektor-T_H	RM4-5; AL-21; IM7
$CD4^+Ly6c^-CD44^-$	naive T_H	RM4-5; AL-21; IM7
$CD4^+Ly6c^-CD44^+$	Memory-/Effektor- oder aktivierte T_H	RM4-5; AL-21; IM7
$CD8a^+$	$CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7;
$CD8a^+$CD62L high	naive $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; MEL-14
$CD8a^+$CD62L low	Memory-/Effektor- oder aktivierte $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; MEL-14
$CD8a^+CD103^+$	$CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$ an Schleimhautepithel	53-6.7; 2E7
$CD8a^+Ly6c^+CD44^+$	Memory-/Effektor- oder aktivierte $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; AL-21; IM7
$CD8a^+Ly6c^+CD44^-$	Memory-/Effektor- oder aktivierte $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; AL-21; IM7
$CD8a^+Ly6c^-CD44^-$	naive $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; AL-21; IM7
$CD8a^+Ly6c^-CD44^+$	Memory-/Effektor- oder aktivierte $CD8a^+$-$T_{zytotoxisch}$	53-6.7; AL-21; IM7
$CD8b^+$	$CD8b^+$-$T_{zytotoxisch}$	H35-17.2
$CD45^+$ (= B220)	Leukozyten	RA3-6B2
$CD45^+IgD^-$	immature B-Zellen	RA3-6B2; 11-26c.2a
$CD45^+IgD^+$	mature B-Zellen	RA3-6B2; 11-26c.2a
$CD19^+$	B-Zellen	1D3
$CD19^+CD5^+$	B_1-Zellen	1D3; 53-7.3
$CD19^+CD5^-$	B_2-Zellen	1D3; 53-7.3
$CD97^+$ (=Gr1)	Granulozyten, aktivierte T- und B-Zellen	RB6-8C5
$CD97^+CD11b^+$	Granulozyten	RB6-8C5; M1/70
$CD11b^+CD97^-$	Monozyten	M1/70
$CD49b^+$	NK-Zellen	$DX5^+$

Tab.4: Oberflächenmarker (linke Spalte) und dazugehörige Zellpopulationen (mittlere Spalte) der FACS-Analyse. Die rechte Spalte enthält die dazugehörigen monoklonalen Antikörper (Klone).

2.12 Isolierung humaner peripherer mononukleärer Zellen (PBMC)

Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut wurden über eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen polynukleären Zellen getrennt. Dies basiert darauf, dass Ficoll eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten hat, aber gleichzeitig Erythrozyten und Granulozyten eine geringere Dichte haben.

Die Zellisolierung erfolgte aus Buffy Coats von gesunden Blutspendern, die innerhalb von 24 h nach der Blutabnahme bearbeitet wurden. Die Isolierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Das Blut der Blutspender wurde mit Medium-AB 1:2 verdünnt und je 9 ml davon vorsichtig auf 3 ml Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin) in 12 ml Röhrchen geschichtet. Nach der Zentrifugation bei 400 g für 35 min und RT waren 4 Schichten im Röhrchen zu erkennen. Die oberste Schicht enthält das Plasma, welches zur späteren Antikörperbestimmung abgenommen und eingefroren wurde, darunter ist die Schicht mit den zu isolierenden PBMC, die oberhalb des Ficolls als milchige Bande zu erkennen sind und die unterste Schicht besteht aus den polynukleären Granulozyten und Erythrozyten. Die PBMC wurden mittels einer Pasteurpipette abgenommen und in einem 50 ml Falcon mit Medium-AB auf 50 ml aufgefüllt. Die folgende Zentrifugation wurde bei 4°C, 400 g für 10 min durchgeführt. Nachdem der Überstand dekantiert wurde, konnte das Zellpellet resuspendiert und der Waschschritt nochmals mit 50 ml Medium-AB wiederholt werden. Das erhaltene Pellet wurde erneut resuspendiert und in 10 ml Medium-FBS-AB aufgenommen. Die Gesamtzahl der lebenden PBMC wurde nach Trypanblaufärbung der toten Zellen mittels der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl wurde mit Medium-FBS-AB auf $1x10^7$ Zellen/ml eingestellt.

2.13 Stimulierung humaner PBMC *in vitro*

Die isolierten humanen PBMC wurden unter sterilen Bedingungen in 48-Well Zellkulturplatten (Costar 3548, NY, USA) kultiviert. Eine Übersicht der durchgeführten Ansätze gibt Tab.5 wieder.

Für die Bestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand wurden pro Well $2x10^6$ Zellen eingesetzt und 200 µl EmMed mit 3-5 Vesikel bzw. ohne Vesikel zugegeben. Um die Vesikel beim Pipettieren nicht zu beschädigen, wurde eine 1 ml Pipettenspitze verwendet, an deren vorderem Ende etwa ein ½ cm abgeschnitten wurde. Der EmMed samt Vesikel stammte aus Metacestodenkulturen, denen 4 Tage zuvor zuletzt das Medium gewechselt wurde. Noch am selben Tag wurde der abgenommene EmMed für den Zellkulturansatz verwendet.

Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne EmMed kultiviert wurden. Die Stimulierung mit 50 µl *E. coli* LPS (026:B6) erfolgte nach 2 h Vorinkubation des Zellkulturansatzes im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die Endkonzentration des eingesetzten LPS betrug pro Well 100 ng/ml. Alle Ansätze wurden zur Kontrolle auch ohne LPS Stimulierung parallel durchgeführt. Das Endvolumen pro Well wurde auf 1 ml, bzw. bei Wells in denen nachträglich noch LPS zugegeben wurde auf 950 µl, mit Zellkulturmedium Medium-FBS-AB aufgefüllt. Alle Ansätze wurden zweifach angesetzt.
Für die Restimulations-Versuche wurden zusätzliche Ansätze gemacht, die genauso behandelt wurden wie oben beschrieben. Nach 96 h wurden diese Ansätze mit 5 µg/ml PHA restimuliert und die Überstände nach 144 h abgenommen. Als Kontrollen dienten Zellen, die nicht restimuliert und für 144 h kultiviert wurden.
Nach 4, 24, 48, 72, 96 h und 144 h Inkubation im Brutschrank bei den oben genannten Bedingungen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei 400 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend entnommen und in 1,2 ml Deep-Well-Blöcken (PeqLab, Erlangen) bei -20°C gelagert.

Zur Analyse der Genexpression mittels DNA-Microarrays wurden die Ansätze, wie bereits oben beschrieben, durchgeführt, wobei jedoch pro Well $5x10^6$ Zellen eingesetzt wurden. Um genügend Ausgangsmaterial für die RNA-Extraktion zu bekommen, wurden 12-fach Ansätze gemacht. Die Abnahme der Zellkulturüberstände, sowie der Zellen wurde 48 h nach LPS Stimulation durchgeführt und erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Eis. Die Zellkulturüberstände mitsamt den Zellen wurden abgenommen und in 12 ml Röhrchen mit gleichen Ansätzen vereinigt. Nach einer Zentrifugation bei 800 g für 10 min bei 4°C wurde der Überstand für spätere Zytokinmessungen abgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 ml kaltes, steriles PBS zugegeben. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das PBS vollständig abgenommen und das Zellpellet bei -80°C eingefroren.

Zum Testen von verschiedenen Fraktionen des EmMed und der Medium-FBS-AB-Kontrolle der HPLC wurden die lyophilisierten Fraktionen in jeweils 600 µl sterilem PBS aufgenommen und durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert (Millex®-GV, 0,22 µm 13 mm, Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irland). Eingesetzt wurden 100 µl der Fraktion (ca. 75 µg) bei $2x10^6$ Zellen in 1 ml Endvolumen. Bei den Fraktionen der PD-10-Säule wurden pro Zellkulturansatz 200 µl der Fraktion bei $2x10^6$ Zellen in 1 ml Endvolumen zugegeben.

Als Kontrolle wurde die gleiche Menge an sterilem PBS verwendet. Nach 2 h Vorinkubation der Zellen mit den Fraktionen wurden die Ansätze mit *E. coli* LPS stimuliert (Endkonzentration 100 ng/ml). Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellkulturabstände abgenommen, durch Zentrifugation von den Zellen getrennt (800 g für 5 min bei RT) und in 1,2 ml Deep-Well Blöcken bei -20°C gelagert.

Zytokinmessung	**Microarray-Genexpression**	**Testen von Fraktionen**
200 µl Zellen ($2x10^6$ Zellen/ml)	500 µl Zellen ($5x10^6$ Zellen/ml)	200 µl Zellen ($2x10^6$ Zellen/ml)
Evtl. 200 µl Metacestodenkulturüberstand ± Vesikel (20%)		100 µl der Fraktion oder PBS (75 µg/ml)
Evtl. nach 2 h Vorinkubation: 50 µl *E. coli* LPS (100 ng/ml)		
Ad 1 ml Medium-FBS-AB		

Tab.5: Zellkulturansätze zur Messung der Zytokinproduktion, der Genexpression sowie für das Testen der Fraktionen. Angegeben sind die jeweils eingesetzten Volumina pro Well, sowie die Endkonzentration pro ml (in Klammern).

2.14 Bestimmung der Genexpression mittels DNA-Microarray-Analyse

Um den Einfluss des EmMed auf humane LPS-stimulierte PBMC zu untersuchen, wurde von 3 Blutspendern PBMC isoliert und im Beisein von EmMed (4-Tage Kultur) und *E. coli* LPS für 48 h kultiviert. Als Vergleich dienten PBMC derselben Blutspender, die ebenfalls mit LPS stimuliert wurden, allerdings ohne EmMed inkubiert wurden (s. Kap.2.13).

Die Genexpressions-Analyse wurde an der Microarray Facility Tübingen durchgeführt. Zunächst wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert. Die RNA-Qualität und -Quantität wurde mittels eines 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA, USA) photometrisch bestimmt. Durch eine *in vitro*-Transkription wurde diese in cRNA umgewandelt, wobei gleichzeitig biotinmarkierte Nukleotide eingebaut wurden. Verwendet wurden HGU 133+2.0 Oligonukleotid-Mikroarrays von Affymetrix, die mit den Targetsequenzen hybridisiert wurden. Die Signalstärke für jeden Punkt des Arrays wurde mit einem Scanner bestimmt. Der HGU 133+2.0 Chip weist 54675 Probe Sets auf, die jeweils einzelne Gene bzw. Expressed Sequence Tags (EST) repräsentieren.

Die Kriterien für eine differenzielle Genexpression waren eine Signal log ratio, das logarithmierte Verhältnis der Signale zweier Chips zueinander, von >1 bzw. <-1 und ein $p<0,05$. Die Signalstärke musste dabei mindestens auf einem Chip größer als 50 sein und die Gene als present gekennzeichnet sein. Die Verrechnung der Rohdaten erfolgte mittels ArrayAssist.

Die gemeinsame Regulierung der Expression von funktionell verbundenen Genen wurde anschließend mit Ingenuity Pathway Analysis 3.1 (IPS, www.ingenuity.com) untersucht (Schoch *et al*. 2004).

2.15 Fraktionierung des EmMed

2.15.1 HPLC

Die Trennung bei einer Reversed-Phase-HPLC (High Performance/Pressure Liquid Chromatography), aber auch bei dem SepPak C18-Cartridge erfolgt nach Hydrophobizität. Dabei findet eine hydrophobe Wechselwirkung der zu analysierenden Lösung mit der unpolaren stationären Phase, der C18-Kohlenwasserstoffkette, im polaren wässrigen Lösungsmittel (System A) statt. Die Elution erfolgt durch ein unpolares organisches Lösungsmittel (System B, welches Acetonitril enthält), das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurriert. Im Gradientenverlauf wird durch Konzentrationen, die zeitlich ansteigen, von Acetonitril zur wässrigen Phase die Polarität verringert und somit die Elutionskraft erhöht. Hydrophile Substanzen, z. B. Salze werden somit als erstes abgegeben, wohingegen hydrophobe Substanzen eine engere Bindung mit der C18-Säule eingehen und erst bei einer höheren Konzentration von Acetonitril eluiert werden.

Für die Fraktionierung des EmMed wurde der Überstand aus einer 7-Tage Kultur zu je 20 ml in 50 ml Gefäße verteilt. Vor der HPLC wurde eine Trennung über ein SepPak C18-Cartridge (Waters Corporation, Milford, MA, USA) vorgenommen. Dafür wurde das C18-Cartridge zunächst mit einer 10 ml Spritze zweimal mit 5 ml 100%igem Methanol gewaschen und anschließend durch fünfmaliges Spülen mit 5 ml System A equilibriert. Nun wurde die Säule mit 10 ml des EmMed beladen. Der Durchfluss, der vorwiegend Salze enthielt, wurde nochmals mit der Spritze aufgenommen und erneut durch das C18-Cartridge gedrückt, um eine höhere Ausbeute an niedermolekularen Molekülen zu bekommen, die zuvor nicht in dem Cartridge binden konnten. Die Elution der in dem Cartridge gebundenen Peptide und Proteine erfolgte durch zweimaliges Einspritzen von je 5 ml 50%igem System A in Acetonitril. Das Eluat wurde daraufhin sofort bei -80°C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Zur Sicherheit wurde zusätzlich einmal mit System B eluiert, wodurch auch schwer lösliche Produkte ausgewaschen werden konnten. Dieses Eluat wurde gesondert aufgefangen und ebenfalls bei -80°C gelagert. Indem das C18-Cartridge zweimal mit 10 ml 100%igem Methanol gewaschen wurde, konnte es später erneut verwendet werden.

Die HPLC wurde am Medizinisch-Naturwissenschaftlichem Forschungszentrum bei der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kalbacher durchgeführt. Für die HPLC wurde das Lyophilisat (ca. 40 mg aus vormals 20 ml EmMed) in 2 ml System A aufgenommen und zum Lösen für 1 min ins Ultraschallbad gestellt. Die Suspension wurde anschließend bei 13000 g für 1 min bei RT zentrifugiert. Vom Überstand wurde für einen ersten analytischen HPLC-Lauf (L-4000A UV-Detector bei 214 nm, L-6200 Intelligent Pump und D-2500 Chromato-Integrater, Merck Hitachi, Darmstadt) über eine C18-Säule 100 µl, in späteren Läufen 0,7 bis 1 ml eingespritzt. Nach der Probeninjektion wird bei einer HPLC die mobile Phase über die Chromatographiesäule geleitet und zum Detektor geführt. Bei unserer Detektion wurde die UV-Adsorption bei, für Peptide gebräuchlichen, 214 nm bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein HPLC-Lauf mit 1 ml Medium-FBS-AB, der parallel zum EmMed ebenfalls über eine SepPak C18-Säule getrennt, dann lyophilisiert und in ebenfalls 2 ml System A aufgenommen wurde. Die gleichen Fraktionen von mehreren Läufen wurden in einem 12 ml Gefäß auf Eis aufgefangen und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren und erneut lyophilisiert. Der HPLC-Lauf begann mit 100% System A und 0% System B, wobei sich das Verhältnis innerhalb von 40 min linear auf 20% System A und 80% System B umkehrte. Vor sowie zwischen den jeweiligen Läufen wurde die C18-Säule für jeweils 8 min zunächst mit 100%igem Methanol, dann mit 100% System A gespült.

2.15.2 PD-10-Säule

Zur Fraktionierung des EmMed wurde die PD-10-Säule (Pharmacia, Peapack, NJ, USA) verwendet. Durch die Säule wurden zunächst unter sterilen Bedingungen zweimal 10 ml steriles PBS mit einer 10 ml Spritze gedrückt, anschließend wurde 1 ml des EmMed durch die Säule gedrückt. Das Eluat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Dieses erste aufgefangene Eluat wurde als Nr. 1 bezeichnet. Nun wurde erneut 1 ml PBS durch die PD-10-Säule gedrückt und in einem zweiten Reaktionsgefäß gesammelt. Dieser Schritt wurde nun nochmals bis zum Eluat Nr. 16 wiederholt. Die Eluate wurden mittels eines 0,22 µm Filter sterilfiltriert und bei -20°C bis zum Testen in der PBMC-Zellkultur gelagert.

2.16 LC/ESI-MS-Analyse und Edman-Abbau

Um die aktive Komponente des EmMed zu identifizieren, wurde von PANATecs, Tübingen, eine LC/ESI-MS (Liquid Chromatography/Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie) Analyse durchgeführt. Dies ist eine Kopplung der Chromatographie mit der ESI-MS, wodurch eine direkte Korrelation der Retentionszeit des Analyten über das UV-Chromatogramm und der entsprechenden Masse über den Total-Ionenstrom möglich ist.

Bei der ESI-MS kommt es zunächst in einem elektrostatischem Feld zu einer Dispersion der zu analysierenden Flüssigkeit. Die Analyt-Moleküle werden in einem Gemisch aus dipolarem organischem Lösungsmittel, welches z. B. Acetonitril enthält, und, beim Nachweis von positiv geladenen Analyt-Ionen, verdünnten wässrigen Säuren (z. B. TFA) aufgenommen. Bei der ESI werden im elektrischen Feld Ionen bei Atmosphärendruck in die Gasphase transferiert, wobei zunächst aus den Elektrolyten kleine geladene Tröpfchen gebildet werden. Durch Verdampfen kommt es zu einem kontinuierlichen Lösungsmittelverlust, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt. Der hohe Dampfdruck des organischen Lösungsmittels beschleunigt dabei die Verdampfung und das saure Milieu unterstützt die Protonierung der Analytmoleküle. Der wiederholte spontane Zerfall der Tröpfchen führt zu Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen), die beim Eintritt in das Massenspektrometer desolvatisieren. Die Massenanalyse kann mittels einer Ionenfalle erfolgen, bei der die Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld eingefangen werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführte LC/ESI-MS wurde eine Kapillar-HPLC (1100 Serie, Agilent, Waldbronn) und ein Esquire 3000 Ionenfallen-Massenspektrometer mit Standard ESI-Quelle (Bruker-Daltonics, Bremen) verwendet. Als Säule diente eine Zorbax-Extend C18, (3,5 µm, 150 x 0,3 mm). Die Flussrate betrug dabei 5 µl/min und die Detektion erfolgte bei einer UV-Adsorption bei 214 nm on-line. Die verwendeten Lösungen waren 0,025% TFA in Wasser (System A) und 0,023% TFA, 80% Acetonitril in Wasser (System B). Der Gradient war von 0-5 min 5% System B, von 5-30 min 5-80% System B.

Verwendet wurde eine LC-MS mit positivem Ionisierungsmodus, 3800 V Ionisierungsspannung, 7 l/min Trockengas (300°) und 25 psi Nebulizer. Die Falle wurde automatisch kontrolliert beladen (25000 ICC). Injiziert wurden 3 µl der 18.6 min Fraktion der wie im vorherigen Kapitel durchgeführten HPLC des EmMed.

Die Peptidsequenz der 18,6 min Fraktion des EmMed wurde zudem am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie bei Prof. Dr. Stevanovic nach dem Edman-Abbau bestimmt. Dafür wurde die 18,6 min Fraktion des EmMed tryptisch verdaut (vom Medizinisch-Naturwissenschaftlichem Forschungszentrum, der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kalbacher). Beim Edman-Abbau wird in einer zyklischen Reaktion, vom N-terminalen Ende der Peptidkette eine Aminosäure nach der anderen abgespalten. Im ersten Schritt wird an die freie N-terminal Aminogruppe der Peptidkette Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt und es entsteht Phenylthiocarbamoylpeptid (PTC-Peptid). Mit einer wasserfreien Säure wird nun die erste Aminosäure als Anilinothiazolinon(ATZ)-Aminosäure abgespalten und anschließend zur stabileren Phenylthiohydantoin(PTH)-Aminosäure konvertiert. Da die PTH-Aminosäuren ein charakteristisches UV-Spektrum bei 269 nm und einen spezifischen molaren Absorptionskoeffizienten besitzen, kann in der Reversed-Phase-HPLC die Aminosäuresequenz bestimmt werden.

2.17 Synthese von Fibrinopeptid B

Am Medizinisch-Naturwissenschaftlichem Forschungszentrum wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Kalbacher das Fibrinopeptid B synthetisch hergestellt.

2.18 Protein-Quantifizierung nach dem BCA-Verfahren

Zur Protein-Quantifizierung wurde der Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit von Pierce (Rockford, IL, USA) verwendet. Die Protein-Identifikation beruht auf einer Reduktion im alkalischen Milieu von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Proteine. Durch die Chelatbildung von 2 Molekülen der Bicinchoninsäure (BCA) mit einem Cu^{1+} Ion kommt es zu einem lila gefärbten Reaktionsprodukt.

Die Durchführung der Protein-Quantifizierung erfolgte nach Herstellerangaben. Zunächst wurde ein Albumin (BSA) Standard mit einer Reichweite von 0,5 bis 20 µg/ml erstellt und die zu messenden Antigene zu unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt. Zur Verdünnung des Standards und der Proben wurde 1xPBS verwendet. Von den Standards und Proben wurden jeweils 50 µl pro Well in 96-Well Mikrotiterplatten gegeben (Costar, NY, USA). Direkt danach wurden 50 µl der Reaktionslösung hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde aus 25 Teilen der Lösung MA, 24 Teilen der Lösung MB und einem Teil der Lösung MC frisch angesetzt.

Von den Proben und Standards wurden Doppelbestimmungen vorgenommen. Die Proben wurden bei 37°C für 2 h inkubiert. Nach dem Abkühlen der Platte auf RT konnte die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm im ELISA-Reader ermittelt werden. Die Quantifizierung der Proteinmenge der Proben erfolgte anhand der BSA-Standardkurve.

2.19 Hitzeinaktivierung des EmMed

Zur Hitzeinaktivierung wurde der EmMed einer 4-Tage Kultur für 30 min bei 56°C im Wasserbad erwärmt. Anschließend wurde der hitzeinaktivierte EmMed bei -20°C gelagert.

2.20 Medien, Puffer und andere Lösungen

0,1 M Natrium-Carbonatpuffer pH 9,5

Für den 0,1 M Natrium-Carbonatpuffer wurden 8,4 g $NaHCO_3$ und 3,56 g Na_2CO_3 in 1 l H_2O_{bd} gelöst. Anschließend wurde ein pH von 9,5 eingestellt. Gelagert wurde der Puffer bei 4°C.

0,2 M Natrium-Phosphatpuffer pH 6,5

Der 0,2 M Natrium-Phosphatpuffer besteht aus 11,8 g Na_2HPO_4 und 16,1 g NaH_2PO_4, gelöst in 1 l H_2O_{bd}. Abschließend wurde der pH auf 6,5 eingestellt. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert.

1xPBS

Zur Herstellung von 1xPBS wurde eine PBS Tablette (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 200 ml H_2O_{bd} gelöst. Gegebenenfalls wurde das 1xPBS im Autoklaven dampfsterilisiert.

CD Hybridoma Medium

Das CD Hybridoma Medium (Gibco, Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland) enthält nur niedermolekulare, chemisch definierte Substanzen. Zu 1 l CD Hybridomamedium wurde 10 ml L-Glutamin (200 mM 100x, Gibco, Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland) sowie 10 ml Antibiotika/Antimykotika (Antibiotic Antimycotic Solution, stabilized (100x), Sigma, St. Louis, MO, USA) beigesetzt.

E. coli LPS

Das lyophilisierte *E. coli* LPS (Stamm 026:B6, Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde in sterilem 1xPBS gelöst und auf 1 mg/ml eingestellt. Für die *in vivo* Versuche wurde das LPS mit sterilem PBS auf 100 ng/ml, für die *in vitro* Versuche auf 2 µg/ml verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das gelöste LPS bei -20°C gelagert.

Hitzeinaktiviertes FBS

Fötales Bovines Serum (Biochrom AG, Berlin) wurde vollständig bei RT aufgetaut und dann für 35 min in ein 56°C warmes Wasserbad gestellt. Das hitzeinaktivierte FBS wurde dann unter sterilen Bedingungen auf 50 ml Gefäße (Greiner bio-One GmbH, Frieckenhausen) aufgeteilt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Medium-FBS-AB

Zu 500 ml Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin (Gibco, Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland) wurden 50 ml hitzeinaktiviertes FBS sowie 5,5 ml Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Antibiotic Antimycotic Solution, stabilized (100x), Sigma, St. Louis, MO, USA) gegeben.

Medium-AB

500 ml Zellkulturmedium RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und L-Glutamin (Gibco, Invitrogen Corporation, Auckland, Neuseeland) wurden mit 5 ml Antibiotika/Antimykotika-Lösung (Antibiotic Antimycotic Solution, stabilized (100x), Sigma, St. Louis, MO, USA) versetzt.

PBS BSA

Für die ELISAs wurde als Blockpuffer PBS BSA verwendet, das immer frisch angesetzt wurde. Dafür wurden zu 50 ml 1xPBS 0,25 g BSA (Albumin bovine serum Fraction V, Sigma, St. Louis, MO, USA) gegeben.

Rompun-Ketanest Narkotikum

Für die Langzeitnarkose der Mäuse wurde ein Gemisch aus Esketaminhydrochlorid (Ketanest®S, Parke-Davis, Berlin; Dosierung: 100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Rompun®2%, Bayer Vital, Leverkusen; Dosierung: 15 mg/kg Körpergewicht) verwendet. Dazu wurden 272 µl Rompun® mit 1454 µl Ketanest®S vermischt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

SES Medium

Je 0,5 ml Serumersatz (SES A und B, 1000x, Biochrom AG, Berlin) wurden zu 500 ml Medium-AB hinzugegeben.

System A

System A wurde für die HPLC benötigt und bestand aus 0,055%iger Trifloressigsäure in LiChrosolv® (Merck, Darmstadt).

System B

System B wurde ebenfalls für die HPLC verwendet und enthielt 80%iges Acetonitril (Merck, Darmstadt) mit 0,45% Trifloressigsäure.

TMB Substrat

TMB Substrat wurde vor jeder Verwendung aus einem Teil Wasserstoffperoxid-Substrat (0,02%) und einem Teil TMB (TMB Substrat Kit, Pierce, Rockford, IL, USA) angesetzt.

Waschpuffer

Der Waschpuffer für den ELISA bestand aus 1xPBS mit Tween 20. Angesetzt wurde der Waschpuffer aus 80 g NaCl, 14,2 g Na_2HPO_4, 2 g KH_2PO_4 und 2 g KCl, die in insgesamt 10 l H_2O_{bd} gelöst wurden. Anschließend wurden 500 µl Tween 20 (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) hinzugegeben.

2.21 Statistik

Signifikante Änderungen der Zytokinkonzentration wurden nach Stabilisierung der Daten durch eine logarithmische Transformation (log(pg/ml + 0,5)) bestimmt. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden auf Signifikanz getestet. Dazu wurde das Statistik-Softwareprogramm Jump 5.0.1 benutzt. Signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen als *($p<0,05$) gekennzeichnet und hochsignifikante Unterschiede mit **($p<0,001$).

Die Abbildungen geben jeweils die arithmetischen Mittelwerte mit Standardfehler an (aM ± SEM), wobei bei den Maus-ELISA logarithmierte Werte dargestellt wurden, während bei den humanen ELISA die Werte in pg/ml bzw. ng/ml angegeben wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Sepsisversuch mit *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen

3.1.1 Zytokinproduktion

Um den Einfluss einer Filarieninfektion mit *L. sigmodontis* auf eine LPS-induzierte Sepsis zu untersuchen, wurden C57BL/6-Mäuse mit Mikrofilarien oder mit adulten Würmern infiziert. Die erste Blutabnahme erfolgte acht bzw. neun Tage nach der Implantation der adulten Filarien, bzw. ein bis zwei Stunden nach der Mikrofilarieninfektion. Die i. p. LPS-Injektion wurde einen Tag nach der Mikrofilarieninfektion bzw. zehn bis 14 Tage nach der Implantation adulter Filarien durchgeführt. Eine Stunde sowie sechs Stunden nach LPS-Gabe wurde Blut für die Zytokinbestimmung abgenommen.

Die erfolgreiche Infektion mit Mikrofilarien wurde eine Stunde nach der Infektion überprüft, wobei bei allen Tieren im Blut Mikrofilarien gefunden werden konnten.
Die Vitalität der implantierten Filarien wurde nach Versuchsende bei der Obduktion der Mäuse untersucht. Bei allen Mäusen konnten dabei vitale Filarien wiedergefunden werden. Die Mäuse, die Filarien aus patent-infizierten Tieren implantiert bekommen hatten, waren zudem nachweislich im Blut Mikrofilarien-positiv, wohingegen bei den Mäusen mit Filarien aus postpatenten und präpatenten Infektionen keine Mikrofilarien im Blut gefunden werden konnten. Allerdings hatten diese Tiere Mikrofilarien im Peritoneum.

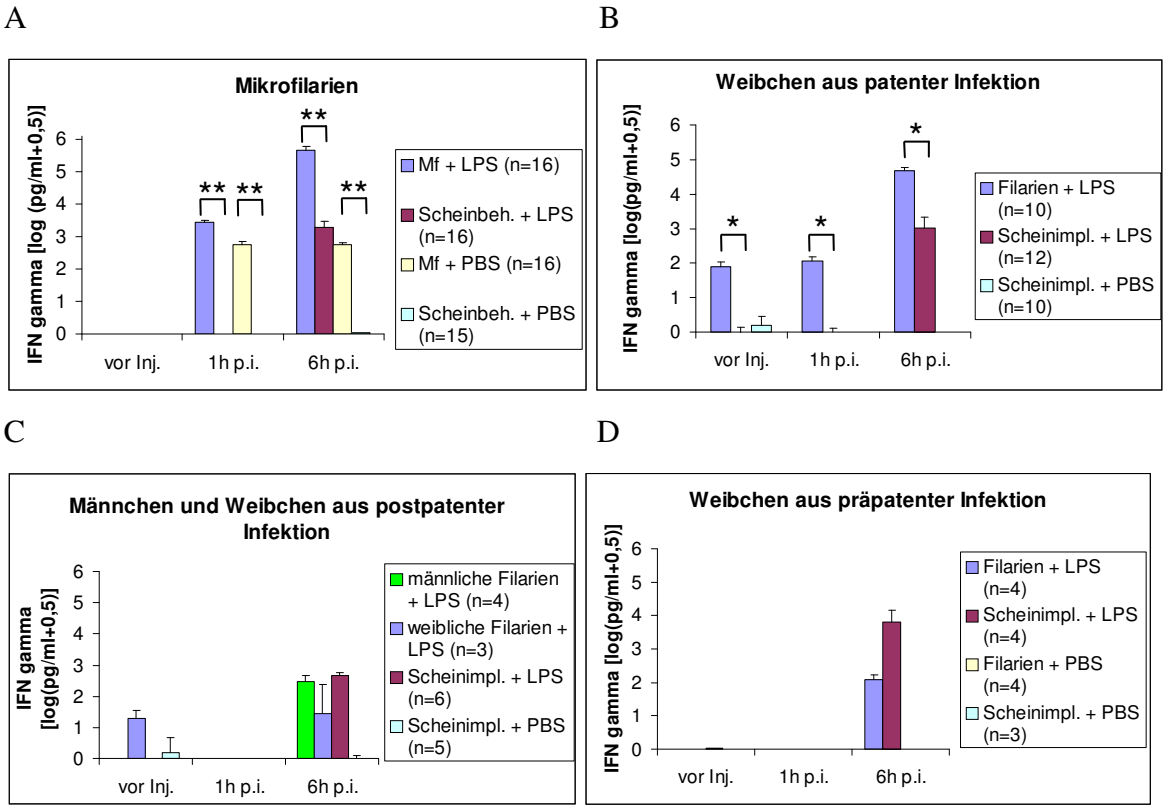


Abb.5: IFNγ-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05; **p<0,0001), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

Eine Stunde nach der LPS-Injektion, konnte bei den Tieren mit Mikrofilarien IFNγ detektiert werden (Tiere mit LPS 3098 ± 360 pg/ml; Tiere mit PBS 677±86 pg/ml), während die Werte bei scheinbehandelten Tieren noch unterhalb der Nachweisgrenze lagen (Abb.5 A). Sechs Stunden nach der Injektion von LPS hatten Mikrofilarien-infizierte Tiere mit LPS signifikant höhere Werte von IFNγ (674138±132482 pg/ml) als die scheinbehandelten Tiere mit LPS-Injektion (4944±1759 pg/ml). Bei den PBS-Kontrollen blieb der IFNγ-Gehalt im Plasma bei Mikrofilarien-infizierten Tieren unverändert (614±54 pg/ml) während die scheinbehandelten Tiere weiterhin unterhalb der Nachweisgrenze waren. Vor der LPS-Injektion konnte bei den Mäusen noch kein IFNγ im Plasma nachgewiesen werden.

Die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen führte dazu, dass vor der Injektion (111±27 pg/ml) und eine Stunde nach der Injektion von LPS (146±42 pg/ml) IFNγ im Plasma nachgewiesen werden konnte, während die scheinimplantierten Tiere weitestgehend über den gesamten Untersuchungszeitraum unterhalb der Nachweisgrenze blieben (Abb.5 B). Ein Anstieg der IFNγ-Konzentration erfolgte sechs Stunden nach der LPS-Injektion, wobei die Tiere mit implantierten weiblichen Filarien aus patenten Infektionen signifikant höhere IFNγ-Werte hatten (54997±9192 pg/ml) als die scheinimplantierten (4753±2091 pg/ml).

Auch die Implantation von weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen induzierte geringe Werte von IFNγ (27±16 pg/ml), wobei diese nur vor der Injektion von LPS nachgewiesen werden konnten und eine Stunde nach der LPS-Injektion unterhalb der Nachweisgrenze lagen (Abb.5 C). Tiere, die männliche Filarien implantiert bekamen und fünf von sechs scheinimplantierte Tiere, produzierten in diesem Zeitraum kein IFNγ in nachweisbarer Menge. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion war die IFNγ-Konzentration in Tieren mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen (247±217 pg/ml) oder männlichen Filarien (362±169 pg/ml) etwas geringer als die IFNγ-Werte der scheinimplantierten Tiere (495±79 pg/ml).

Vor und eine Stunde nach der LPS-Injektion konnte bei den Tieren mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen und den scheinimplantierten Tieren kein IFNγ nachgewiesen werden (Abb.5 D). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten Tiere mit Filarien aus präpatenten Infektionen geringere IFNγ-Konzentrationen (145±47 pg/ml) als die scheinimplantierten Tiere (11599±4431 pg/ml). Bei den PBS-Kontrollen wurde auch sechs Stunden nach der Injektion kein IFNγ nachgewiesen.

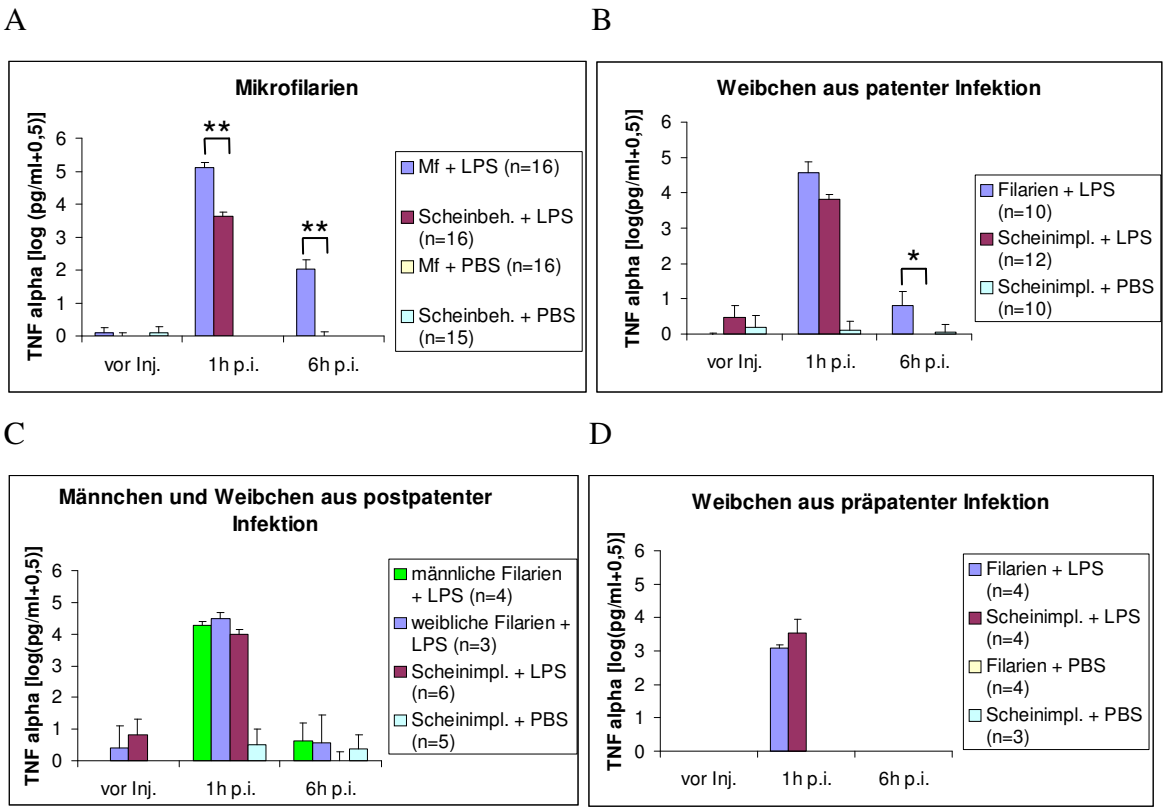


Abb.6: TNFα-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05; **p<0,0001), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

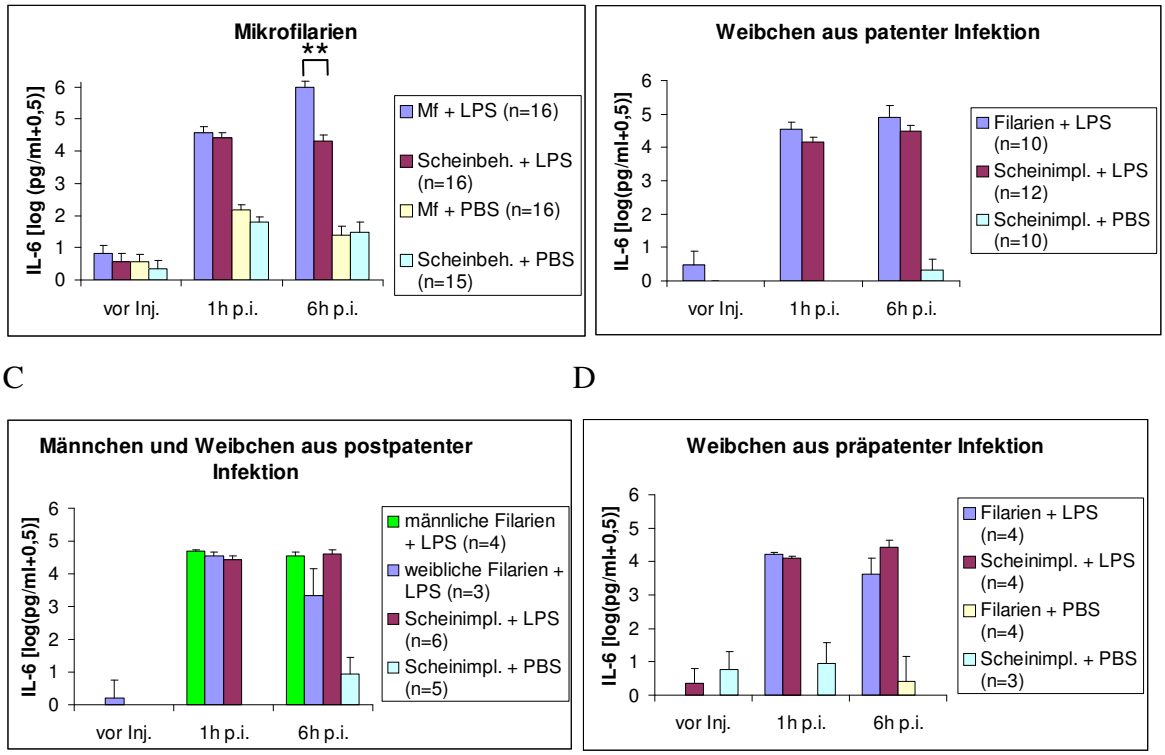
Eine Stunde nach der LPS-Injektion war die TNFα-Konzentration maximal, wobei Mikrofilarien-infizierte Tiere signifikant mehr TNFα (257818±83587 pg/ml) als die scheinbehandelten Kontrollen aufwiesen (Abb.6 A; 5997±940 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion war bei 14 von 16 Mikrofilarien-infizierten Tieren die TNFα-Konzentration noch messbar (313±73 pg/ml), während dies bei den scheinbehandelten LPS-Kontrollen nur noch bei zwei von 16 Tieren möglich war (46±46 pg/ml). Die PBS-behandelten Tiere hatten sowohl eine als auch sechs Stunden nach der Injektion kein messbares TNFα im Plasma. Vor der Injektion von LPS konnte bei den meisten Tieren, unabhängig davon, ob sie Mikrofilarien-infiziert oder scheinbehandelt waren, keine messbare TNFα-Konzentration im Plasma der Mäuse ermittelt werden.

Die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen wirkte sich ähnlich wie die Injektion von Mikrofilarien aus (Abb.6 B). Eine Stunde nach der LPS-Injektion war die TNFα-Konzentration im Plasma von Tieren mit weiblichen Filarien aus patenten Infektionen höher (152321±71090 pg/ml) als bei scheinimplantierten Tieren (9773±2220 pg/ml). Dieser Effekt war sechs Stunden nach der LPS-Injektion signifikant (44±20 pg/ml gegenüber 2±2 pg/ml). Vor der LPS-Injektion ließen sich bei einigen Tieren geringe Konzentrationen von TNFα im Plasma nachweisen. Bei acht von zehn PBS-behandelten Tieren war während des gesamten Versuchs kein TNFα messbar.

Tiere mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion mit 36251±14821 pg/ml höhere TNFα-Konzentrationen im Plasma als Tiere mit männlichen Filarien (21567±7416 pg/ml) oder Scheinimplantation (Abb.6 C; 12131±3170 pg/ml). Die LPS-Injektion führte eine Stunde nach der Injektion zu einem deutlichen Anstieg der TNFα-Konzentration im Vergleich zu den PBS-Kontrollen (21±14 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion waren keine Unterschiede mehr in der TNFα-Konzentration im Plasma der verschieden behandelten Tiere erkennbar. Vor der Injektion von LPS war bei einigen Tieren, die Filarien aus postpatenten Infektionen bekommen hatten oder scheinimplantiert wurden, geringe Mengen an TNFα nachweisbar, während alle Tiere mit männlichen Filarien kein nachweisbares TNFα produzierten.

Mäuse mit implantierten Filarien aus präpatenten Infektionen hatten eine Stunde nach LPS-Injektion eine geringere TNFα-Konzentration im Plasma (1340±288 pg/ml) als die scheinbehandelten Tiere (Abb.6 D; 6646±2233 pg/ml). Bei den LPS-injizierten Tieren konnte nur eine Stunde nach der Injektion TNFα nachgewiesen werden. Filarien-implantierte und scheinimplantierte Tiere mit PBS-Injektion produzierten zu keinem Zeitpunkt nachweisbare Mengen an TNFα.

A B



C D

Abb.7: IL-6-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05; **p<0,0001), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

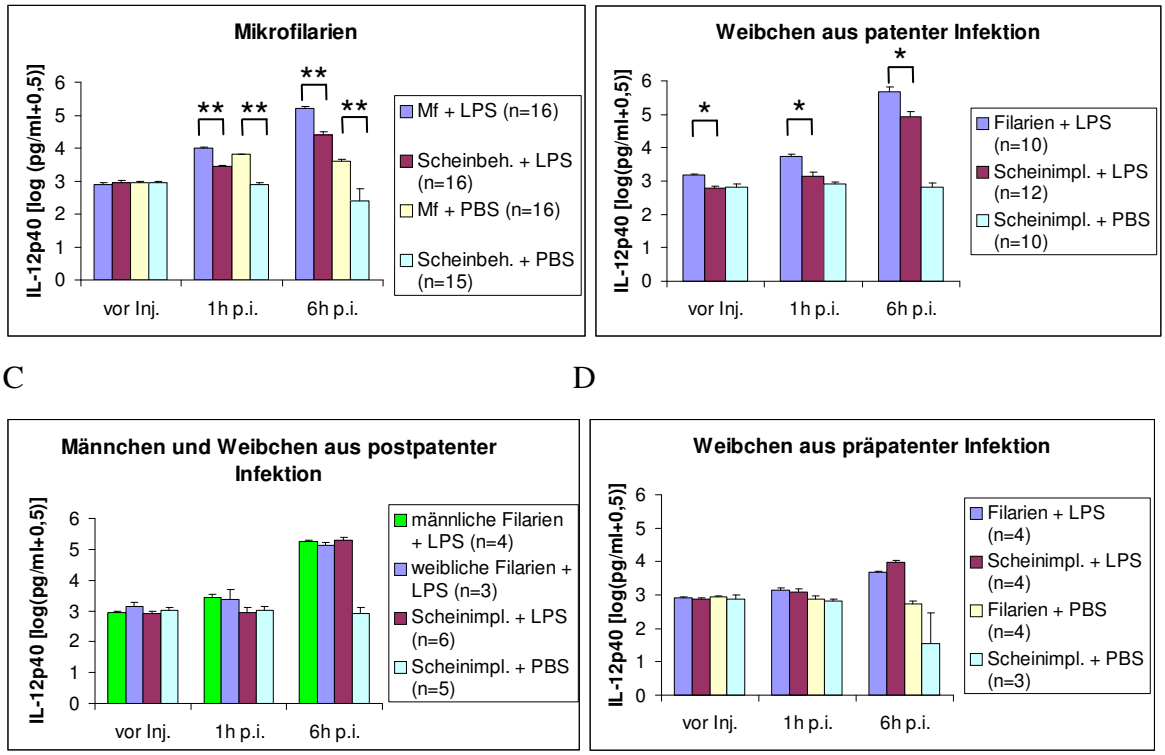
Sechs Stunden nach der LPS-Injektion war die IL-6-Konzentration bei Mikrofilarien-infizierten (1895364±392372 pg/ml) im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren (44461±9475 pg/ml) signifikant erhöht (Abb.7 A). Mikrofilarien-infizierte Tiere produzierten dabei bereits eine Stunde nach der Injektion etwas höhere Mengen an IL-6 (mit LPS 91074±21976 pg/ml, ohne LPS 295±62 pg/ml) als scheinbehandelte Tiere (48542±8149 pg/ml und 142±45 pg/ml). Die Verabreichung von LPS führte ab einer Stunde nach der Injektion zu einem signifikanten Anstieg von IL-6 im Vergleich zu der Plasmakonzentration von Tieren, die PBS erhielten. IL-6 konnte bei der Hälfte der Tiere, unabhängig vom Infektionsstatus, bereits vor der LPS-Injektion in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die PBS-behandelten Tiere hatten sechs Stunden nach der Injektion unabhängig von ihrem Infektionsstatus ähnliche Werte an IL-6 im Plasma (mit Mikrofilarien 118±42 pg/ml, Scheinbehandlung 93±38 pg/ml).

Mäuse mit Filarien aus patenten Infektionen hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion etwa doppelt soviel IL-6 im Plasma (77429±22682 pg/ml) wie die scheinimplantierten Tiere (Abb.7 B; 28736±10493 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion war dieser Unterschied noch deutlicher (475792±253269 pg/ml gegenüber 59641±20692 pg/ml). Die Injektion von LPS erhöhte ab einer Stunde nach der Injektion die IL-6-Konzentration signifikant im Vergleich zu den PBS-Kontrollen. Die Implantation von Filarien aus patenten Infektionen führte vor der Injektion von LPS bei drei von zehn Mäusen zu einer geringen Produktion von IL-6, während bei den scheinimplantierten Tieren kein IL-6 nachgewiesen werden konnte. Bei den scheinimplantierten Tieren, die PBS bekamen, konnten nur sechs Stunden nach der Injektion und nur bei drei von zehn Tieren geringe Konzentrationen an IL-6 nachgewiesen werden.

Die Injektion von LPS führte allgemein zu einem Anstieg der IL-6-Konzentration, wobei Mäuse mit implantierten männlichen Filarien eine Stunde nach der Injektion am meisten IL-6 produzierten (Abb.7 C; 50516±5186 pg/ml). Mäuse mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen wiesen eine Stunde nach LPS-Injektion etwa dieselben IL-6-Konzentrationen (38810±12566 pg/ml) wie die scheinimplantierten Tiere (33251±10040 pg/ml) auf. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion nahm bei Tieren mit männlichen Filarien und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen die IL-6-Werte im Vergleich zu den ein-Stunden-Werten ab (38939±10340 pg/ml und 11975±9061 pg/ml), während die scheinimplantierten Tiere zu diesem Zeitpunkt die höchsten IL-6-Werte hatten (46059±8821 pg/ml). Während zu den beiden früheren Zeitpunkten bei PBS-behandelten Tieren kein IL-6 nachweisbar war, konnten bei drei der sechs Tiere sechs Stunden nach der PBS-Injektion geringe Mengen an IL-6 nachgewiesen werden. Bei einem Tier mit Filarien aus postpatenten Infektionen konnte vor der Injektion von LPS IL-6 im Plasma nachgewiesen werden. Alle anderen Tiere hatten eine IL-6-Konzentration, die zu diesem Zeitpunkt unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Eine Stunde nach der LPS-Injektion zeigten Mäuse mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen die höchsten IL-6-Werte (17075±2561 pg/ml), während scheinimplantierte Tiere etwas weniger aufwiesen (Abb.7 D; 12781±2116 pg/ml). Dieses Verhältnis kehrte sich sechs Stunden nach der LPS-Injektion um (14136±7763 pg/ml und 34287±10670 pg/ml). Die Implantation von weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen erhöhte nicht die IL-6-Konzentration vor der LPS-Injektion. Im Gegensatz dazu ließen sich bei vier der sieben scheinimplantierten Tiere zu diesem Zeitpunkt geringe Konzentrationen an IL-6 nachweisen.

A B



C D

Abb.8: IL-12p40-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05; **p<0,0001), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

Eine Stunde nach der Injektion von LPS kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-12p40-Konzentration bei Mikrofilarien-infizierten Tieren, unabhängig davon, ob sie LPS (10848±1147 pg/ml) oder PBS (6471±359 pg/ml) erhielten, im Vergleich zu den entsprechenden scheinbehandelten Kontrollen (Abb.8 A; mit LPS 2999±338 pg/ml, mit PBS 870±224 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten Mikrofilarien-infizierte LPS-behandelte Tiere die höchsten IL-12p40-Werte (197064±32771 pg/ml), die signifikant über denen von schein- und LPS-behandelten Tieren lagen (30899±4189 pg/ml). Die PBS-behandelten Mikrofilarien-positiven Tiere zeigten signifikant geringere IL-12p40-Konzentrationen (4559±688 pg/ml) als die LPS-injizierten Mäuse, wiesen jedoch noch signifikant höhere Werte als die scheinbehandelten PBS-Kontrolltiere auf (1148±268 pg/ml). Die IL-12p40-Konzentration lag bei allen Tieren vor der Injektion bei etwa 1000 pg/ml.

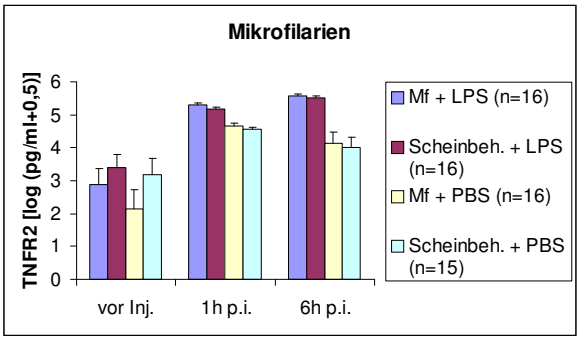
Auch die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen führte zu einem Anstieg der IL-12p40-Konzentration im Vergleich zum Plasma scheinimplantierter Tiere, der

zu allen drei Zeitpunkten signifikant war (Abb.8 B; vor Injektion 1564±151 pg/ml gegenüber 693±91 pg/ml, eine Stunde nach LPS-Injektion 6168±929 pg/ml gegenüber 1780±294 pg/ml und sechs Stunden nach der LPS-Injektion 734896±210626 pg/ml gegenüber 129467±28146 pg/ml). Die Werte der scheinimplantierten PBS-behandelten Tiere waren dabei unverändert bei ca. 800 pg/ml.

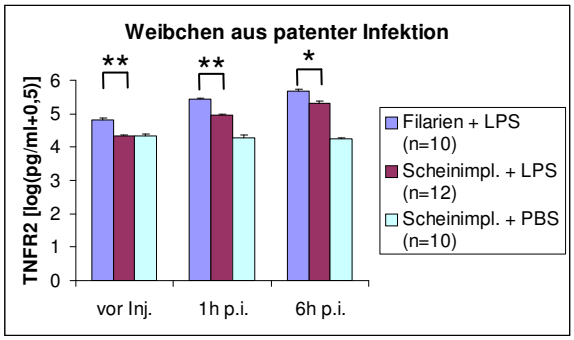
Acht Tage nach der Implantation hatten die Mäuse mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen die höchsten IL-12p40-Werte im Plasma (Abb.8 C; 1494±415 pg/ml). Mäuse mit männlichen adulten Filarien und scheinimplantierte Tiere zeigten vor der Injektion von LPS bzw. PBS etwa gleich hohe Werte an IL-12p40 (916±46, 886±131 pg/ml und 1116±208 pg/ml). Eine Stunde nach der LPS-Injektion stieg die IL-12p40-Konzentration bei den Tieren mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen (3598±1868 pg/ml) und mit männlichen Filarien (2938±489 pg/ml) im Vergleich zu den scheinimplantierten Tieren mit PBS- (1204±264 pg/ml), aber auch LPS-Injektion (1141±239 pg/ml) deutlich an. Die mit LPS-behandelten und mit männlichen (176676±18229 pg/ml) und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen implantierten Tiere (140383±30723 pg/ml) hatten sechs Stunden nach der Injektion etwas geringere Werte als die scheinimplantierten Tiere, wobei diese jedoch deutlich über denen der Ein-Stunden-Werte lagen. Die LPS-behandelten scheinimplantierten Tiere zeigten sechs Stunden nach der Injektion die höchsten IL-12p40-Werte (208887±27829 pg/ml). Die PBS-behandelten Tiere hatten auch sechs Stunden nach der Injektion IL-12p40-Konzentrationen (1143±342 pg/ml), die auf dem Niveau der vorherigen Zeitpunkte lagen.

LPS-behandelte Tiere, die Filarien aus präpatenten Infektionen implantiert bekommen hatten, hatten sechs Stunden nach der LPS-Injektion etwa halb so hohe IL-12p40-Werte (4839±387 pg/ml) wie die scheinimplantierten Tiere (Abb.8 D; 10048±1297 pg/ml). Eine Stunde nach der Injektion war die IL-12p40-Konzentration im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren (mit Filarien aus präpatenten Infektionen 806±140 pg/ml, mit Scheinimplantation 670±77 pg/ml) unabhängig vom Infektionsstatus bei LPS-behandelten Tieren leicht erhöht (mit Filarien aus präpatenten Infektionen 1451±167 pg/ml, mit Scheinimplantation 1309±237 pg/ml). Vor der LPS-Injektion lag die IL-12p40-Konzentration bei Tieren mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen oder der entsprechenden Scheinimplantation bei allen Gruppen bei etwa 800 pg/ml. Die PBS-behandelten Mäuse hatten sechs Stunden nach der Injektion etwas geringere IL-12p40-Werte als zu den beiden vorherigen Zeitpunkten.

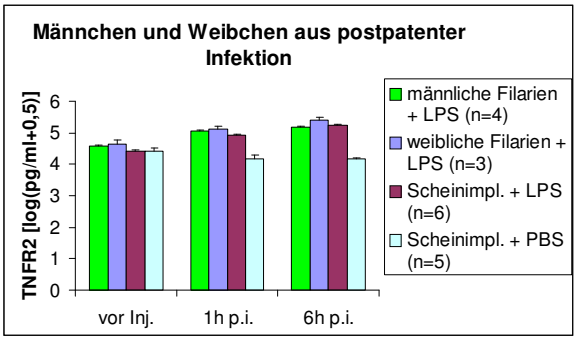
A



B



C



D

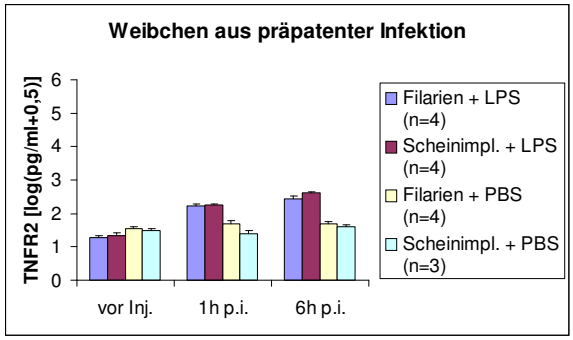


Abb.9: TNFR2-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*$p<0,05$; **$p<0,0001$), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

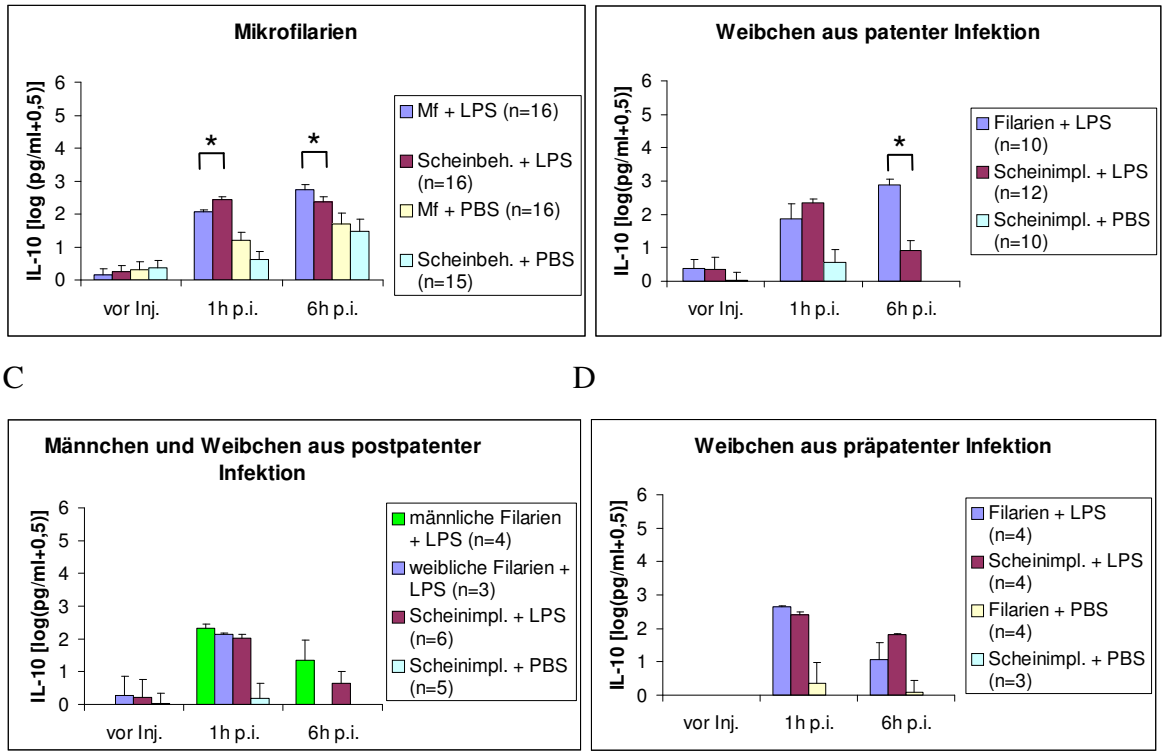
Die TNFR2-Konzentration unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant bei Mikrofilarien-infizierten und scheinbehandelten Tieren (Abb.9 A). Die Injektion von LPS erhöhte nach einer und nach sechs Stunden die TNFR2-Konzentration im Plasma signifikant (mit Mikrofilarien nach einer Stunde 216±22 ng/ml, nach sechs Stunden 435±56 ng/ml, mit Scheinbehandlung nach einer Stunde 170±21 ng/ml, nach sechs Stunden 359±39 ng/ml) im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren (mit Mikrofilarien nach einer Stunde 56±8 ng/ml, nach sechs Stunden 38±8 ng/ml, mit Scheinbehandlung nach einer Stunde 41±5 ng/ml, nach sechs Stunden 25±5 ng/ml). Der TNFR2 wurde bereits vor der LPS-Injektion in hohen Mengen von den Mäusen produziert (Mittelwerte von 10-20 ng/ml).

Im Gegensatz dazu induzierte die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen die Freisetzung von TNFR2 zusätzlich (Abb.9 B). Dabei gab es zu allen drei Zeitpunkten signifikante Unterschiede zwischen LPS-behandelten Tieren mit Filarien aus patenten Infektionen (vor Injektion 71±10 ng/ml, nach einer Stunde 282±18 ng/ml, nach sechs Stunden 491±45 ng/ml) und scheinbehandelten Mäusen (vor Injektion 23±2 ng/ml, nach einer Stunde 96±7 ng/ml, nach sechs Stunden 221±19 ng/ml). Die TNFR2-Konzentration bei LPS-behandelten Tieren war eine und sechs Stunden nach der Injektion signifikant erhöht im Vergleich zu der von Mäusen, die PBS erhielten (nach einer Stunde 22±3 ng/ml, nach sechs Stunden 18±1 ng/ml).

Auch männliche (37±3 ng/ml) und weibliche Filarien aus postpatenten Infektionen (47±13 ng/ml) erhöhten bereits vor der LPS-Injektion die TNFR2-Konzentration im Plasma der Mäuse im Vergleich zu der von scheinimplantierten Tieren (Abb.9 C, 23±3 ng/ml). Eine und sechs Stunden nach der LPS-Injektion wiesen die Tiere, die männliche Filarien implantiert bekommen hatten, etwa dieselben TNFR2-Werte (nach einer Stunde 111±12 ng/ml, nach sechs Stunden 155±10 ng/ml) wie die scheinimplantierten Tiere auf (nach einer Stunde 85±8 ng/ml, nach sechs Stunden 181±10 ng/ml). Mäuse mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen hatten im Vergleich dazu leicht erhöhte TNFR2-Konzentrationen (nach einer Stunde 140±26 ng/ml, nach sechs Stunden 264±44 ng/ml). Die TNFR2-Konzentration bei den PBS-Kontrollen nahm im Gegensatz dazu mit der Zeit leicht ab (nach einer Stunde 18±5 ng/ml, nach sechs Stunden 15±2 ng/ml).

Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen wiesen eine Stunde nach der LPS-Injektion gleich hohe TNFR2-Werte auf (173±23 ng/ml) wie scheinimplantierte Tiere (177±14 ng/ml), während nach sechs Stunden die Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen eine geringere TNFR2-Konzentration im Vergleich zu den scheinimplantierten Mäusen hatten (Abb.9 D; 289±45 ng/ml verglichen zu 423±17 ng/ml). Vor der Injektion von LPS wurden bei den Mäusen mit Filarien aus präpatenten Infektionen und Scheinimplantation TNFR2-Konzentrationen mit Mittelwerten von 19-35 ng/ml gemessen. Bei den PBS-behandelten Tieren war nur eine Stunde nach der Injektion eine leichte Erhöhung der TNFR2-Konzentration bei Tieren mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen (53±10 ng/ml) verglichen zu scheinimplantierten Tieren (26±5 ng/ml) zu erkennen.

A B



C D

Abb.10: IL-10-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. In Abb. C sind Tiere mit männlichen und weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen, in Abb. D mit Filarien aus präpatenten Infektionen dargestellt. Die Kontrolltiere für die Abb. B-D wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*$p<0,05$; **$p<0,0001$), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

Die Infektion mit Mikrofilarien steigerte nicht die IL-10-Produktion der Mäuse vor der LPS-Injektion (Abb.10 A). Hingegen erhöhte die LPS-Gabe die IL-10-Konzentration im Plasma signifikant im Vergleich zu den PBS-Kontrollen, wobei die Mikrofilarien-positiven Tiere eine Stunde nach der LPS-Injektion signifikant niedrigere IL-10-Konzentrationen hatten (133±19 pg/ml) als die scheinbehandelten Tiere (330±54 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion kehrte sich dieses Verhältnis um, so dass die Mikrofilarien-infizierten Tiere signifikant höhere IL-10-Konzentrationen aufwiesen (938±170 pg/ml) als die Scheinbehandelten (520±120 pg/ml). Bei den PBS-behandelten Tieren nahm die IL-10-Konzentration mit der Zeit auf etwa 300 pg/ml zu, wobei es keine Unterschiede zwischen Mikrofilarien-infizierten und scheinbehandelten Tieren gab.

Die IL-10-Konzentration glich nach der Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen der von Mikrofilarien-infizierten Mäusen (Abb.10 B). Vor der Injektion von LPS konnten keine Unterschiede in der IL-10-Ausschüttung zwischen Mäusen mit Filarien aus patenten Infektionen oder einer Scheinimplantation detektiert werden, wobei eine Stunde nach der LPS-Injektion die Tiere mit Filarien aus patenten Infektionen gleich hohe IL-10-Werte (302±66 pg/ml) wie die scheinimplantierten Tiere (311±66 pg/ml) aufwiesen. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten jedoch die Tiere mit Filarien aus patenten Infektionen (1251±320 pg/ml) signifikant höhere IL-10-Werte als die scheinimplantierten Mäuse (52±28 pg/ml).

Mäuse, die weibliche oder aber männliche Filarien aus postpatenten Infektionen implantiert bekommen hatten unterschieden sich in der IL-10-Ausschüttung weder vor der LPS-Injektion (Mittelwerte von 0-125 pg/ml) noch eine Stunde nach der LPS-Injektion von den scheinimplantierten Tieren (Abb.10 C, Mittelwerte von 130-241 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion konnten noch bei vereinzelten Tieren mit männlichen Filarien oder Scheinimplantation geringe Konzentrationen an IL-10 gemessen werden.

Bei den Tieren, die Filarien aus präpatenten Infektionen implantiert bekommen hatten, war die IL-10-Konzentration eine Stunde nach der LPS-Injektion maximal (437±51 pg/ml) und etwas höher als bei den gleichbehandelten scheinimplantierten Tieren (Abb.10 D, 268±55 pg/ml). Hingegen hatten sechs Stunden nach der LPS-Injektion die Mäuse mit Filarien aus präpatenten Infektionen etwa gleich hohe IL-10-Werte (43±27 pg/ml) wie die scheinimplantierten Tiere (64±4 pg/ml). Vor der LPS-Injektion konnte kein IL-10 nachgewiesen werden.

A B

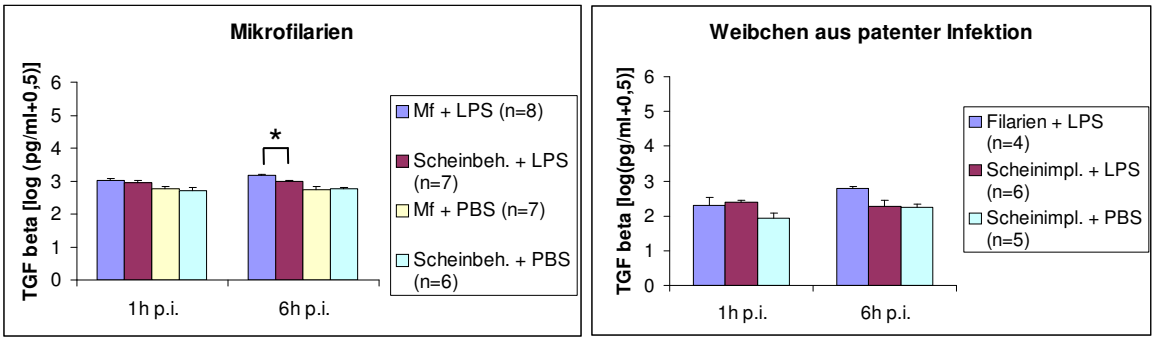


Abb.11: TGFβ-Konzentration im Plasma von C57BL/6-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt Mikrofilarien- (Mf) bzw. scheinbehandelte Tiere (Scheinbeh.). Abb. B gibt die Ergebnisse von Tieren wieder, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen erhielten. Die Kontrolltiere für die Abb. B wurden scheinimplantiert (Scheinimpl.). Signifikante Unterschiede wurden nach dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05; **p<0,0001), wobei signifikante Unterschiede zwischen LPS- und PBS-behandelten Tieren nicht dargestellt sind. (aM ± SEM)

TGFβ wurde bei allen Mäusen nur eine und sechs Stunden nach der LPS-Injektion bestimmt (Abb.11 A, B).

Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten Mikrofilarien-infizierte Tiere signifikant mehr TGFβ als die scheinbehandelten Tiere im Plasma (Abb.11 A). Dabei hatten LPS-behandelte Tiere eine Stunde nach der LPS-Injektion etwas höhere TGFβ-Werte (mit Mikrofilarien 1094±135 pg/ml, Scheinbehandelte 966±129 pg/ml) als die PBS-behandelten Tiere (mit Mikrofilarien 613±87 pg/ml, Scheinbehandelte 531±98 pg/ml), wobei sich der Infektionsstatus nicht auswirkte. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion kam es jedoch allein bei den Mikrofilarien-infizierten Tieren die LPS erhielten zu einem Anstieg der TGFβ-Konzentration auf 1529±79 pg/ml, während die restlichen Tiere einen kaum veränderten TGFβ-Gehalt zeigten.

Die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen wirkte sich ähnlich wie die Injektion von Mikrofilarien auf die TGFβ-Konzentration aus (Abb.11 B). Die Mäuse mit Filarien aus patenten Infektionen wiesen sechs Stunden nach der LPS-Injektion deutlich mehr TGFβ auf (631±95 pg/ml) als die scheinimplantierten Tiere mit LPS- (249±54 pg/ml) und PBS-Injektion (191±43 pg/ml). Eine Stunde nach der Injektion war bei den LPS-behandelten Tieren die TGFβ-Konzentration (mit Filarien aus patenten Infektionen 320±190 pg/ml, Scheinbehandelte 248±29 pg/ml) im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren erhöht (96±24 pg/ml).

3.1.2 Zytokinproduktion von ko-Mäusen

Für die folgenden Sepsisversuche wurden ko-Mäusestämme auf demselben genetischen Hintergrund wie die vorher benutzen C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Kap.3.1.1 beschrieben. Eingesetzt wurden IL-10-ko-Mäuse, die weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen implantiert bekamen. Um den Einfluss der Mikrofilarien auf die LPS-induzierte Sepsis weitergehend zu untersuchen, wurden zudem IFNγR-ko-, MARCO-ko- und TNFR1-ko-Mäuse verwendet. Dabei wurden, dieselben Zytokine wie bei den immunkompetenten C57BL/6-Mäusen im vorherigen Kapitel bestimmt (Kap.3.1.1), wobei hier nur die Zytokine dargestellt werden, die bei den ko-Mäusen differenziell ausgeschüttet wurden.
Der Nachweis von Mikrofilarien im peripheren Blut der Mikrofilarien-infizierten Mäuse war bei allen Tieren positiv. Im peripheren Blut von Mäusen mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen konnten keine Mikrofilarien detektiert werden, wohingegen in deren Peritoneum Mikrofilarien gefunden wurden.

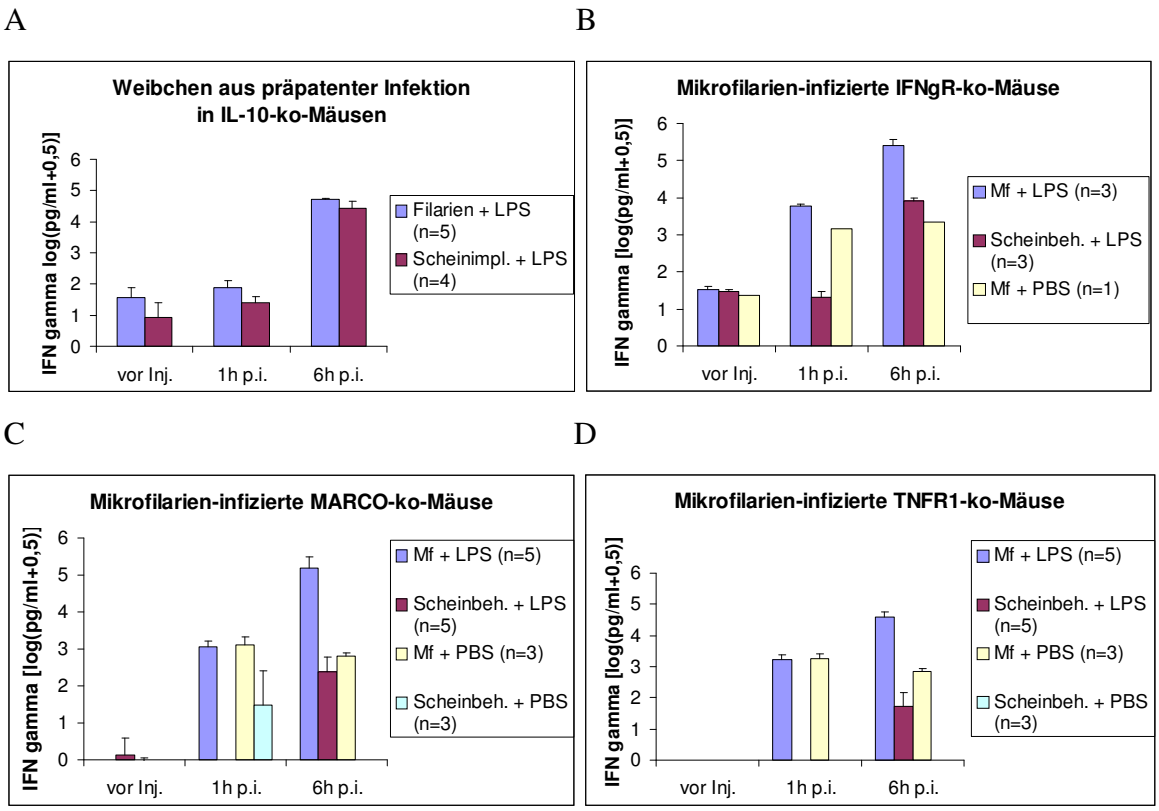


Abb.12: IFNγ-Konzentration im Plasma von ko-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt IL-10-ko-Mäuse, die scheinimplantiert (Scheinimpl.) wurden oder weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen bekamen. Abb. B-D zeigt die Ergebnisse von Tieren, die Mikrofilarien (Mf) erhielten oder scheinbehandelt waren (Scheinbeh.). Bei Abb. B sind die Ergebnisse von IFNγR-ko, bei Abb. C von MARCO-ko und bei Abb. D von TNFR1-ko-Mäusen gezeigt. (aM ± SEM)

IL-10-ko-Mäuse verhielten sich deutlich unterschiedlich im Bezug auf ihre IFNγ-Ausschüttung gegenüber den immunkompetenten C57BL/6-Mäusen. So konnten sowohl vor als auch eine Stunde nach der LPS-Injektion bei den IL-10-ko-Mäusen geringe Werte an IFNγ gemessen werden (Abb.12 A), während sie bei den immunkompetenten Mäusen unterhalb der Nachweisgrenze waren. Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen hatten dabei etwas höhere IFNγ-Konzentrationen (vor Injektion 105±81 pg/ml, nach einer Stunde 149±102 pg/ml), als die scheinbehandelten Kontrollen (vor Injektion 32±25 pg/ml, nach einer Stunde 30±8 pg/ml).
Sechs Stunden nach der LPS-Injektion zeigten die IL-10-ko-Mäuse mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen eindeutig höhere IFNγ-Konzentrationen (51735±4339 pg/ml) als die immunkompetenten Mäuse mit der gleichen Behandlung (145±47 pg/ml). Bei den IL-10-ko-Mäusen wiesen die scheinbehandelten Tiere sechs Stunden nach der LPS-Injektion etwas geringere IFNγ-Werte auf (35584±10153 pg/ml) als die Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen, allerdings war die IFNγ-Konzentration noch immer dreimal so hoch wie bei den gleichbehandelten immunkompetenten Mäusen (11599±4431 pg/ml).

Bei den IFNγR-ko-Mäusen (Abb.12 B) wurden bereits vor der Injektion von LPS bei allen Mäusen geringe Mengen an IFNγ freigesetzt (23-46 pg/ml), wohingegen bei MARCO-ko- (Abb.12 C) und TNFR1-ko-Mäusen (Abb.12 D) zu diesem Zeitpunkt noch kein IFNγ nachgewiesen werden konnte, was auch bei den immunkompetenten Mäusen der Fall war.
Eine Stunde nach der LPS-Injektion konnte bei allen Tieren mit Mikrofilarien, unabhängig von der Injektion von PBS oder LPS, eine erhöhte IFNγ-Konzentration im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren gemessen werden. Dabei gab es bei TNFR1-ko- und MARCO-ko-Mäusen noch keine messbaren Unterschiede zwischen Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS- und PBS-Behandlung. Die MARCO-ko-Mäuse mit Mikrofilarien hatten Werte um 1500 pg/ml und TNFR1-ko Tiere um 2000 pg/ml IFNγ. Die IFNγR-ko-Mäuse hatten hingegen bei LPS-Behandlung und Mikrofilarieninfektion deutlich höhere IFNγ-Konzentrationen (ca. 6074±859 pg/ml), während die PBS-behandelte Maus mit Mikrofilarien 1430 pg/ml IFNγ hatte. Damit unterschieden sich die ko-Mäuse von den immunkompetenten Mäusen, bei denen bereits eine Stunde nach der LPS-Injektion ebenfalls ein LPS-Effekt auf die IFNγ-Konzentration bei Mikrofilarien-infizierten Mäusen messbar war, wobei die IFNγ-Werte jedoch nur halb so hoch wie bei den IFNγR-ko-Mäusen waren (ca. 3100 pg/ml bei LPS-Injektion und 680 pg/ml bei PBS-Behandlung). Die scheinbehandelten LPS-injizierten ko-Mäuse zeigten eine Stunde nach der LPS-Injektion noch keine Zunahme von IFNγ im Vergleich zu den Werten, die

vor der Injektion gemessen wurden, und unterschieden sich somit ebenfalls nicht von den scheinbehandelten immunkompetenten Mäusen.

Sechs Stunden nach der Injektion hatten MARCO-ko- und IFNγR-ko-Mäuse mit Mikrofilarien- und LPS-Injektion deutlich höhere Werte an IFNγ (284847±109235 pg/ml und 295094±86721 pg/ml) als die scheinbehandelten LPS-Kontrollen, aber auch als die Mikrofilarien- und LPS-injizierten TNFR1-ko-Mäuse (47956±12797 pg/ml). Die immunkompetenten Mikrofilarien-infizierten C57BL/6-Mäuse zeigten sechs Stunden nach der LPS-Injektion im Vergleich zu den IFNγR-ko- und TNFR1-ko Stämmen doppelt so hohe Werte von IFNγ (674138 pg/ml). Bei den scheinbehandelten Mäusen war sechs Stunden nach der LPS-Injektion eine Zunahme von IFNγ zu sehen, die bei den IFNγR-ko-Mäusen deutlich stärker war (8462±1352 pg/ml) als bei den TNFR1-ko- (297±247 pg/ml) und MARCO-ko-Mäusen (914±619 pg/ml). Die IFNγ-Konzentration lag dabei bei den TNFR1-ko- und MARCO-ko-Mäusen deutlich unterhalb der gemessenen Konzentration von den immunkompetenten Tieren mit Schein- und LPS-Injektion (ca. 5000 pg/ml). Bei den Mikrofilarien-infizierten PBS-behandelten Tieren nahm die IFNγ-Konzentration bei TNFR1-ko- und MARCO-ko-Mäusen nach sechs Stunden auf 670±150 pg/ml bzw. 718±133 pg/ml ab und lag somit auf dem Niveau der immunkompetenten Mäuse gleicher Behandlung, während die IFNγ-Konzentration bei der IFNγR-ko-Maus auf 2263 pg/ml anstieg.

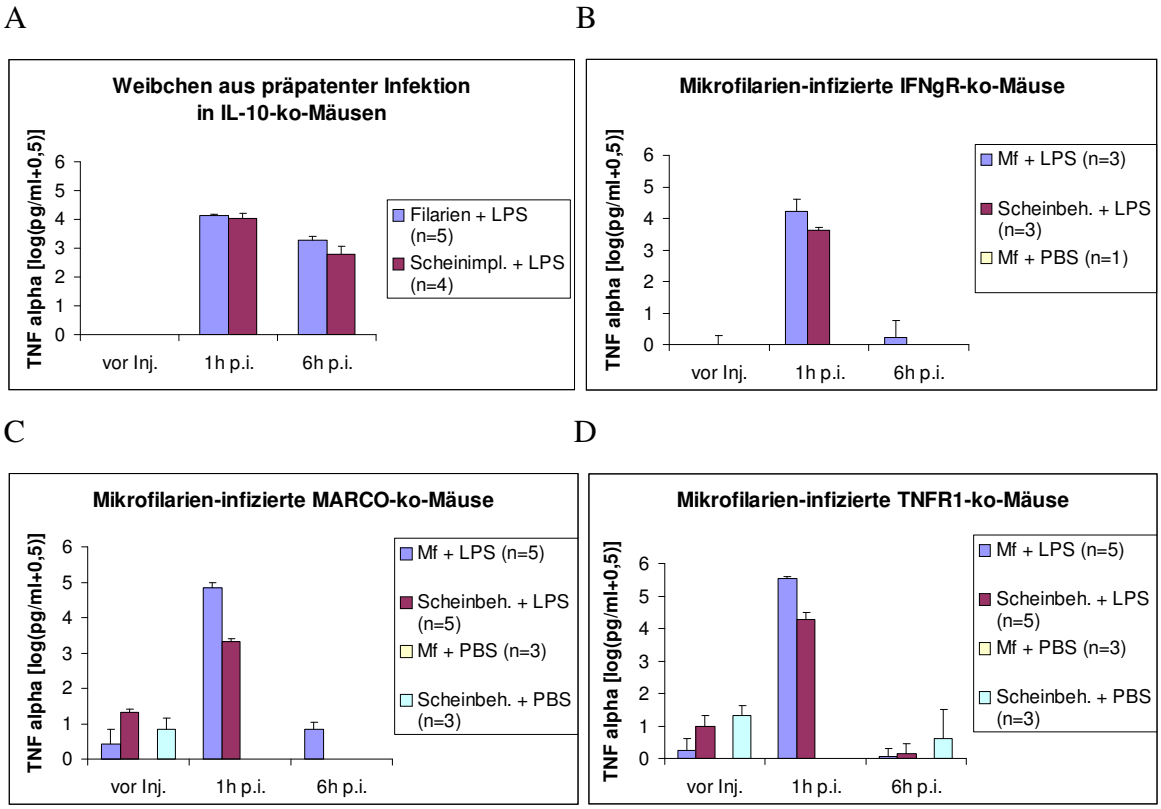


Abb.13: TNFα- Konzentration im Plasma von ko-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt IL-10-ko-Mäuse, die scheinimplantiert (Scheinimpl.) wurden oder weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen bekamen. Abb. B-D zeigt die Ergebnisse von Tieren, die Mikrofilarien (Mf) erhielten oder scheinbehandelt waren (Scheinbeh.). Bei Abb. B sind die Ergebnisse von IFNγR-ko, bei Abb. C von MARCO-ko und bei Abb. D von TNFR1-ko-Mäusen gezeigt. (aM ± SEM)

Die Mikrofilarien-infizierten IL-10-ko-Mäuse mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion zehnmal höhere TNFα-Konzentrationen (14±1,5 ng/ml) als die gleichbehandelten immunkompetenten Mäuse (Abb.13 A). Die scheinimplantierten LPS-behandelten IL-10-ko Tiere hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion gleich hohe TNFα-Werte (13±4,0 ng/ml) wie die ko-Mäuse mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen. Sie lagen deutlich höher als die TNFα-Konzentrationen der scheinbehandelten, LPS-behandelten immunkompetenten Tiere (6,6±2,2 ng/ml).

Sechs Stunden nach der LPS-Injektion zeigten bei den IL-10-ko-Mäusen die Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen (2,2±0,7 ng/ml) als auch die scheinimplatierten Mäuse deutlich höhere TNFα-Werte (0,9±0,3 ng/ml) als die immunkompetenten Mäuse, bei denen kein TNFα mehr messbar war.

Vor der Injektion von LPS lag bei allen IL-10-ko Tieren TNFα unterhalb der Nachweisgrenze. Eine Stunde nach der LPS-Injektion war bei allen Tieren die TNFα-Konzentration maximal, wobei Mikrofilarien-infizierte Tiere am meisten TNFα im Plasma aufwiesen (Abb.13 B-D). Die TNFR1-ko-Mäuse hatten dabei deutlich höhere TNFα-Konzentrationen (360±30 ng/ml) als die MARCO-ko- und IFNγR-ko-Mäuse (89±31 ng/ml und 28±15 ng/ml) und etwas höhere TNFα-Werte als die immunkompetenten Mäuse (258±84 ng/ml). Die scheinbehandelten TNFR1-ko-Mäuse hatten zudem eine Stunde nach der LPS-Injektion deutlich höhere TNFα-Konzentrationen (27±8 ng/ml) als die immunkompetenten Tiere gleicher Behandlung (6±1 ng/ml). Die LPS- und scheinbehandelten MARCO-ko- und IFNγR-ko-Mäuse zeigten hingegen geringere TNFα-Konzentrationen (2,3±0,5 und 4,5±0,8 ng/ml).

Sechs Stunden nach der LPS-Injektion konnte bei den Mikrofilarien-infizierten ko-Mäusen nur vereinzelt TNFα nachgewiesen werden (Mittelwerte von 2-11 pg/ml), während immunkompetente Mäuse noch ca. 300 pg/ml TNFα im Plasma hatten.

Bei den meisten Mäusen konnte vor der LPS-Injektion kein TNFα nachgewiesen werden.

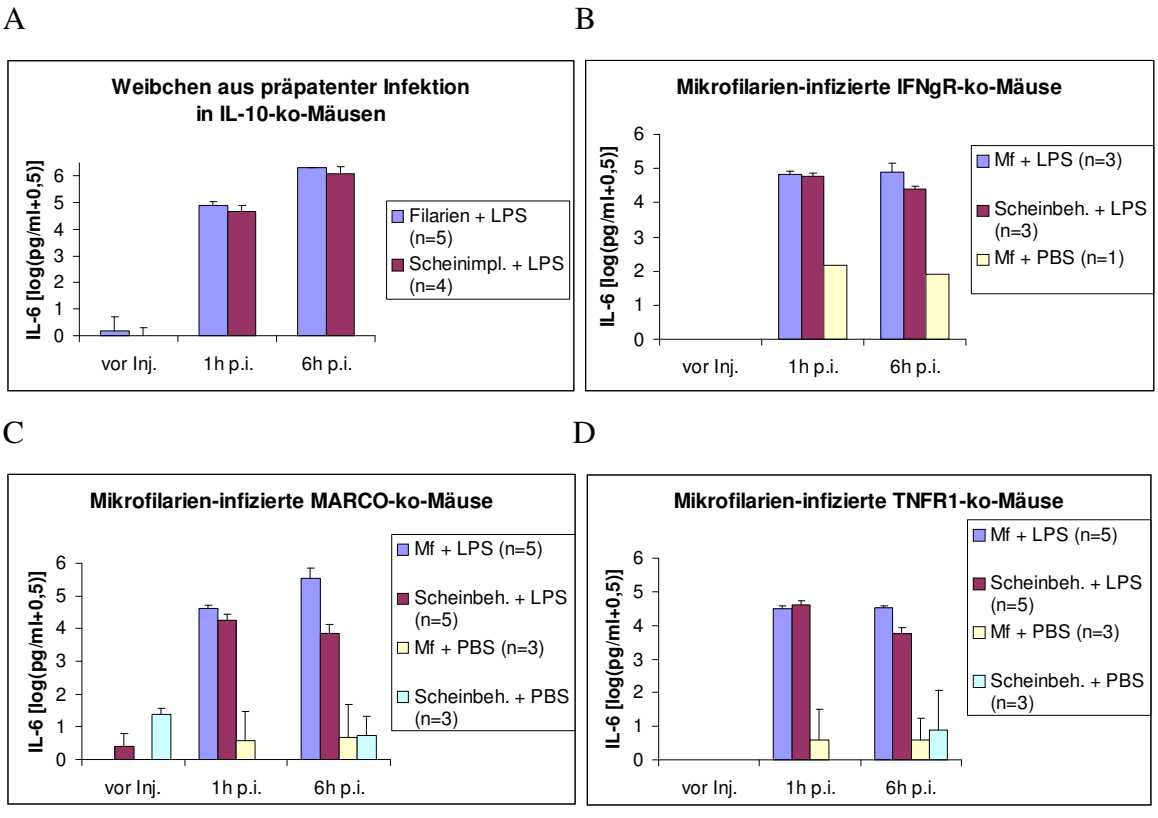


Abb.14: IL-6- Konzentration im Plasma von ko-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt IL-10-ko-Mäuse, die scheinimplantiert (Scheinimpl.) wurden oder weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen bekamen. Abb. B-D zeigt die Ergebnisse von Tieren, die Mikrofilarien (Mf) erhielten oder scheinbehandelt waren (Scheinbeh.). Bei Abb. B sind die Ergebnisse von IFNγR-ko, bei Abb. C von MARCO-ko und bei Abb. D von TNFR1-ko-Mäusen gezeigt. (aM ± SEM)

IL-6 konnte vor der Injektion von LPS in geringen Konzentrationen bei einzelnen IL-10-ko-Tieren nachgewiesen werden (Abb.14 A).
Eine Stunde nach der LPS-Injektion hatten sowohl Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen als auch scheinimplantierte IL-10-ko-Mäuse (97±25 ng/ml und 66±32 ng/ml) deutlich höhere IL-6-Werte als die immunkompetenten Mäuse (17±3 ng/ml und 13±2 ng/ml).
Während bei den immunkompetenten Mäusen die IL-6-Konzentration im Plasma nur bei den scheinimplantierten Tieren sechs Stunden nach der LPS-Injektion weiter anstieg (auf 34±11 ng/ml), nahm sie bei den IL-10-ko-Mäusen sowohl bei den Mäusen, die weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen implantiert hatten als auch bei den scheinimplantierten Tieren deutlich zu (2070±20 ng/ml und 1888±858 ng/ml), und erreichte viel höhere Werte als bei den immunkompetenten Tieren.

Eine Stunde nach der LPS-Injektion waren bei allen Mikrofilarien-infizierten ko-Stämmen geringere IL-6-Konzentrationen als bei immunkompetenten Mäuse messbar (91±22 ng/ml). IFNγR-ko-Mäuse (Abb.14 B) hatten dabei mit 70±12 ng/ml mehr IL-6 im Plasma als die TNFR1-ko- (Abb.14 D, 33±4 ng/ml) und MARCO-ko-Mäuse (Abb.14 C, 46±9 ng/ml). Im Vergleich zu LPS-behandelten Mikrofilarien-infizierten Mäusen hatten die scheinbehandelten LPS-behandelten MARCO-ko-Mäuse nur halb so hohe IL-6-Werte (25±10 ng/ml), während bei den IFNγR-ko-Mäusen kein Unterschied (61±11 ng/ml) und bei den TNFR1-ko-Mäusen eine geringe Zunahme der IL-6-Konzentration (48±13 ng/ml) zu verzeichnen war. Immunkompetente scheinbehandelte Tiere zeigten eine Stunde nach der LPS-Injektion, ähnlich wie die MARCO-ko-Mäuse eine Halbierung der IL-6-Konzentration (49±8 ng/ml) im Vergleich zu den Mikrofilarien-infizierten Tieren.
Sechs Stunden nach der LPS-Injektion konnte jedoch bei allen ko-Mäusen eine deutlich höhere IL-6-Konzentration in Mikrofilarien-infizierten, im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren gefunden werden. Dabei hatten erneut die ko-Mäuse sechs Stunden nach LPS-Injektion deutlich niedrigere IL-6-Werte, unabhängig vom Infektionsstatus, als die immunkompetenten Mäuse (mit Mikrofilarien 1895±392 ng/ml, mit Scheinbehandlung 44±9 ng/ml). Bei IFNγR-ko- und TNFR1-ko-Mäusen erhöhte sich nach LPS-Injektion die IL-6-Konzentration um ca. das vierfache bei Mikrofilarieninfektion (IFNγR-ko 104±45 ng/ml, TNFR1-ko 35±6 ng/ml) im Vergleich zu den scheinbehandelten Tieren (26±4 ng/ml und 9±4 ng/ml). Bei den LPS-behandelten MARCO-ko-Mäusen stieg die IL-6-Konzentration hingegen um ca. das 48-fache bei Mikrofilarien-infizierten (670±249 ng/ml) im Vergleich zu den scheinbehandelten Tieren an

(14±8 ng/ml). Bei den Mikrofilarien-infizierten LPS-behandelten Tieren hatten die MARCO-ko-Mäuse etwa siebenmal höhere IL-6-Konzentrationen im Plasma als die IFNγR-ko- und 19-mal höhere IL-6-Werte als die TNFR1-ko-Mäuse.

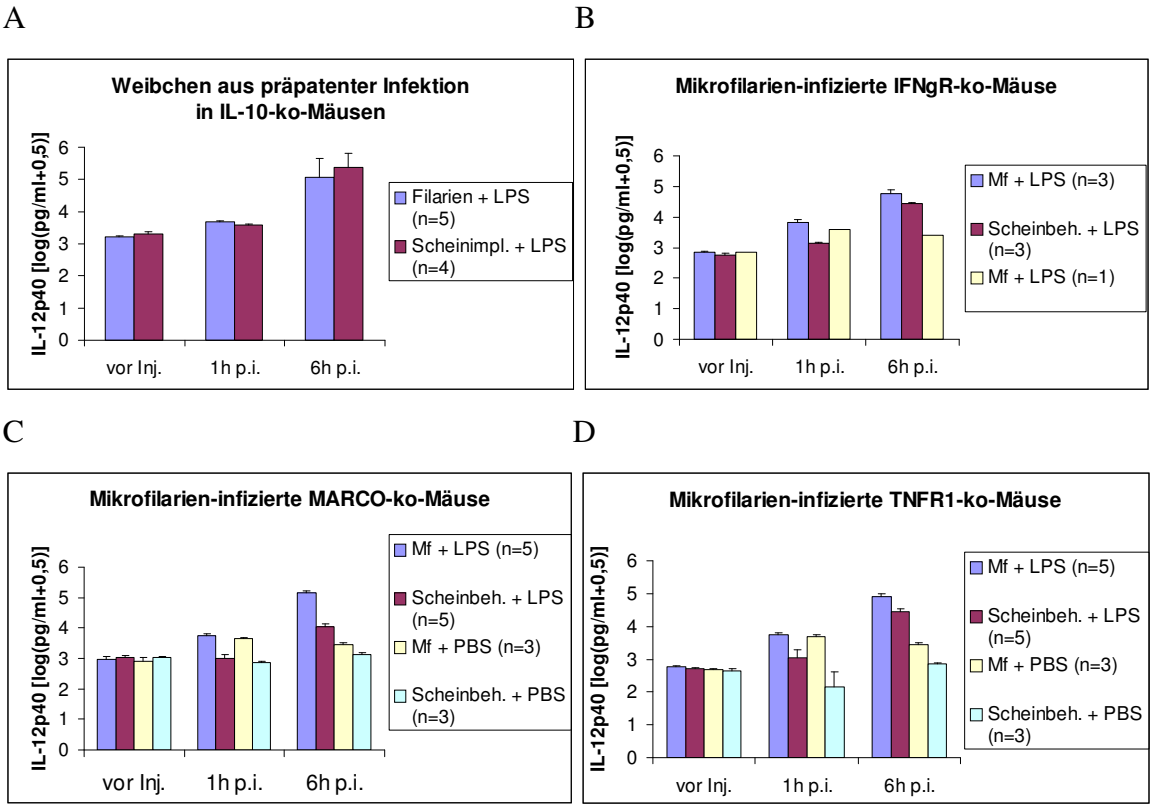


Abb.15: IL-12p40- Konzentration im Plasma von ko-Mäusen vor (vor Inj.) bzw. 1 und 6 h nach der Injektion von PBS bzw. LPS. Abb. A zeigt IL-10-ko-Mäuse, die scheinimplantiert (Scheinimpl.) wurden oder weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen bekamen. Abb. B-D zeigt die Ergebnisse von Tieren, die Mikrofilarien (Mf) erhielten oder scheinbehandelt waren (Scheinbeh.). Bei Abb. B sind die Ergebnisse von IFNγR-ko, bei Abb. C von MARCO-ko und bei Abb. D von TNFR1-ko-Mäusen gezeigt. (aM ± SEM)

IL-10-ko-Mäuse hatten vor der Injektion von LPS eine IL-12p40-Konzentration, die doppelt so hoch war wie diejenige von immunkompetenten Mäusen. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen Filarien- und scheinimplantierten IL-10-ko-Mäusen (Abb.15 A, 1,7±0,2 ng/ml und 2,1±0,2 ng/ml).

Eine Stunde nach der LPS-Injektion nahm die IL-12p40-Konzentration deutlich bei den IL-10-ko-Mäusen zu, wobei die Tiere mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen eine um etwa 1 ng/ml höhere IL-12p40-Konzentration hatten (4,9±0,6 ng/ml) als die scheinimplantierten Mäuse (3,9±0,2 ng/ml). Im Vergleich zu den LPS-behandelten immunkompetenten Tieren waren diese IL-12p40-Konzentrationen etwa dreimal höher (mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen 1,5±0,2 ng/ml, scheinimplantiert 1,3±0,2 ng/ml).

Während sechs Stunden nach der LPS-Injektion die IL-12p40-Konzentration bei IL-10-ko-Mäusen deutlich anstieg und sich nicht wesentlich zwischen Tieren mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen (613±384 ng/ml) und Scheinimplantation (517±205 ng/ml) unterschied, nahm die IL-12p40-Konzentration bei den immunkompetenten Mäusen mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen nur auf knapp 5 ng/ml und mit Scheinimplantation auf 10 ng/ml zu.

Die IL-12p40-Konzentration unterschied sich vor der Injektion von LPS bei den ko-Mäusen (ca. 0,8-1 ng/ml) nicht von den immunkompetenten Tieren. Dabei wurden zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen Mikrofilarien-infizierten und scheinbehandelten Tieren festgestellt (Abb.15 B-D).

Die Mikrofilarien-infizierten ko-Mäuse hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion die höchsten IL-12p40-Werte (IFNγR-ko 7,1±1,6 ng/ml, MARCO-ko 5,8±0,8 ng/ml und TNFR1-ko 5,6±0,8 ng/ml), die jedoch geringer als bei den immunkompetenten Tieren waren (10,8±1,1 ng/ml). Während bei den scheinbehandelten Tieren eine Stunde nach der LPS-Injektion die IL-12p40-Konzentration bei den ko-Mäusen bei ca. 1,5 ng/ml blieb, stieg sie bei den immunkompetenten Mäusen auf ca. 3 ng/ml an und war somit auch niedriger als bei den Mikrofilarien-infizierten PBS-injizierten Tieren. Eine Stunde nach der PBS-Injektion hatten Mikrofilarien-infizierte ko-Mäuse eine höhere IL-12p40-Konzentration als vor der Injektion sowie als scheinbehandelte Tiere eine Stunde nach der PBS-Injektion. Die Mittelwerte lagen dabei zwischen 3,8 ng/ml (IFNγR-ko) und 4,9±0,7 ng/ml (TNFR1-ko) und waren etwas geringer als bei den gleichbehandelten immunkompetenten Mäusen (6,5±0,4 ng/ml).

Auch sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten ko-Mäuse geringere IL-12p40-Werte als die immunkompetenten Mäuse sowohl bei Mikrofilarieninfektion (197±33 ng/ml) als auch bei Scheinbehandlung (31±4 ng/ml). Bei den ko-Mäusen hatten MARCO-ko-Mäuse mit Mikrofilarieninfektion etwa doppelt so hohe IL-12p40-Werte (147±14 ng/ml) wie die anderen ko-Mäuse, aber gleichzeitig bei den scheinbehandelten ko-Mäusen die geringsten IL-12p40-Konzentrationen (12±2 ng/ml). IFNγR-ko- und TNFR1-ko-Mäuse hatten sechs Stunden nach der LPS-Injektion bei Mikrofilarieninfektion deutlich mehr IL-12p40 im Plasma (IFNγR-ko 62±15 ng/ml und TNFR1-ko 88±15 ng/ml) wie die scheinbehandelten Tiere (IFNγR-ko 28±3 ng/ml und TNFR1-ko 30±6 ng/ml). Alle Mikrofilarien-infizierten Tiere hatten sechs Stunden nach der PBS-Injektion etwas geringere IL-12p40-Konzentrationen als nach einer Stunde, unterschieden sich allerdings noch immer deutlich von den scheinbehandelten, PBS-behandelten Mäusen.

3.1.3 Prozentuale Veränderung der Zytokinausschüttung

Die Ergebnisse der Zytokinmessung mittels ELISA wurden für eine bessere Vergleichsmöglichkeit der ausgeschütteten Zytokine zwischen scheinbehandelten bzw. scheinimplantierten Tieren und den Mäusen mit verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis* nach jeweiliger LPS-Injektion prozentual dargestellt. Dabei wurden die gemessenen Zytokine der scheinbehandelten bzw. scheinimplantierten und LPS-injizierten Tiere auf 100% gesetzt und die entsprechende prozentuale Veränderung der mit den verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis* infizierten Tiere berechnet. Bei den ko-Mäusen wurde die prozentuale Veränderung im Vergleich zu den scheinbehandelten und LPS-injizierten ko-Mäusen dargestellt und nicht zu den immunkompetenten Mäusen. Dafür wurden nach der maximalen Zytokinkonzentration der einzelnen Zytokine, für IFNγ, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10 die sechs-Stunden-Werte, für TNFα die ein-Stunden-Werte verwendet.

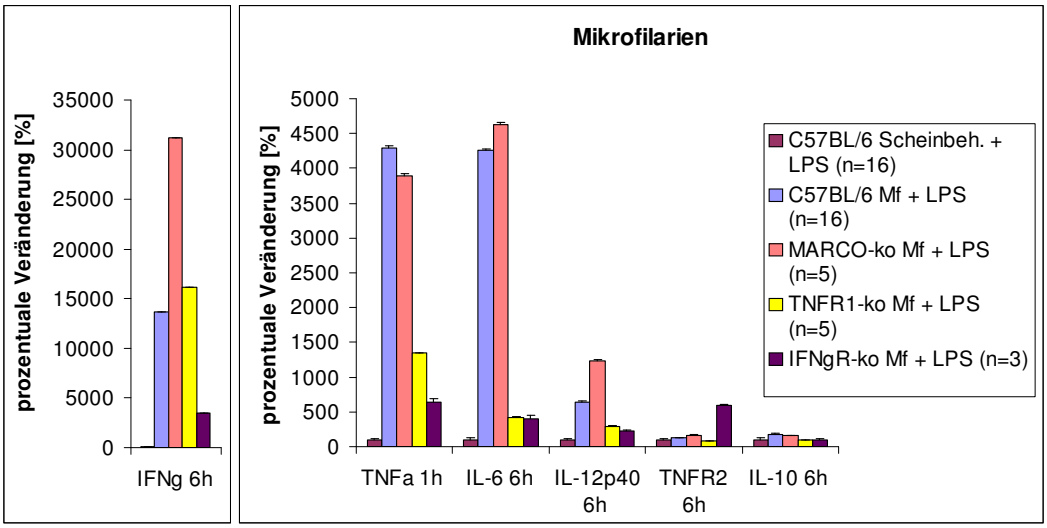


Abb.16: Zytokinausschüttung von Mikrofilarien-infizierten C57BL/6-Mäusen bzw. MARCO-ko-, TNFR1-ko- und IFNγR-ko-Mäusen nach LPS-Injektion (Mikrofilarien + LPS) im Vergleich zu den jeweiligen scheinbehandelten LPS-injizierten Tieren (Scheinbeh. + LPS), deren Zytokinwerte auf 100% gesetzt wurden. Dargestellt sind die Änderungen von IFNγ, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10 6 h nach der LPS-Injektion, sowie von TNFα 1 h nach LPS-Behandlung. (aM ± SEM)

Bei den Mikrofilarien-infizierten Mäusen nahm im Vergleich zu den scheinbehandelten LPS-injizierten Mäusen IFNγ am stärksten zu (Abb.16). Bei immunkompetenten und den TNFR1-ko-Mäusen nahm nach LPS-Injektion bei Mikrofilarien-infizierten im Vergleich zu den scheinbehandelten Tieren die IFNγ-Konzentration um mehr als das 100-fache, bei MARCO-ko-Mäusen sogar über das 300-fache zu, während IFNγR-ko-Mäuse eine 35-fache Erhöhung zeigten. Immunkompetente und MARCO-ko-Mäuse mit Mikrofilarien hatten dabei auch etwa

40-fach höhere TNFα- und IL-6-Konzentrationen als die scheinbehandelten Tiere und 6- bis 12-fach höhere IL-12p40-Werte. Bei den TNFR1-ko- und IFNγR-ko-Mäusen nahmen hingegen die TNFα- und IL-6-Konzentrationen im Vergleich zu den immunkompetenten Mäusen deutlich weniger zu, lagen aber trotzdem 13- (TNFR1-ko) bzw. 6-mal (IFNγR-ko) über der TNFα-Konzentration und viermal über der IL-12p40-Konzentration der scheinbehandelten Tiere. Bei der TNFR2- bzw. IL-10-Konzentration gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschieden behandelten Mäusen.

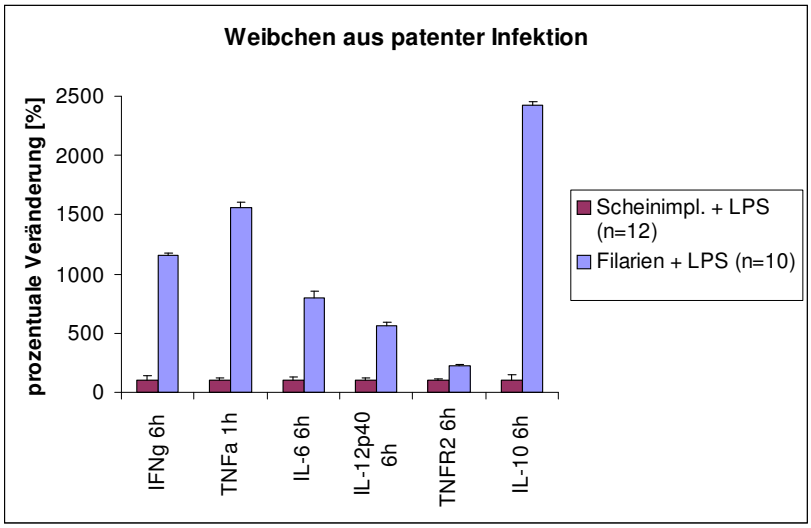


Abb.17: Zytokinausschüttung von C57BL/6-Mäusen mit weiblichen Filarien aus patenten Infektionen nach LPS-Injektion (Filarien + LPS) im Vergleich zu den scheinimplantierten LPS-behandelten Tieren (Scheinimpl. + LPS), deren Werte auf 100% gesetzt wurden. Dargestellt sind die Änderungen von IFNγ, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10 6 h nach der LPS-Injektion, sowie von TNFα 1 h nach LPS-Behandlung. (aM ± SEM)

Mäuse, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen implantiert bekommen hatten, produzierten nach LPS-Injektion bei allen gemessenen Zytokinen vermehrte Konzentrationen im Vergleich zu den scheinimplantierten Mäusen (Abb.17). Dabei wurde die IL-10-Konzentration durch eine Implantation von Filarien aus patenten Infektionen mit einer 25-fachen Erhöhung gegenüber scheinimplantierten Tieren nach LPS-Injektion am stärksten hochreguliert. Von den T_H1-Zytokinen wurde TNFα ca. 16-mal höher bei Filarien-implantierten LPS-behandelten Tieren vorgefunden als bei den scheinimplantierten LPS-behandelten Tieren. IFNγ, IL-6 und IL-12p40 waren um das 11-, 8- und 6-fache bei Filarien-implantierten Mäusen mit LPS-Injektion im Vergleich zu den scheinimplantierten Tieren erhöht. Die TNFR2-Konzentration war bei den Mäusen mit weiblichen Filarien aus patenten Infektionen sechs Stunden nach der LPS-Injektion etwa doppelt so hoch wie bei den scheinimplantierten Kontrolltieren.

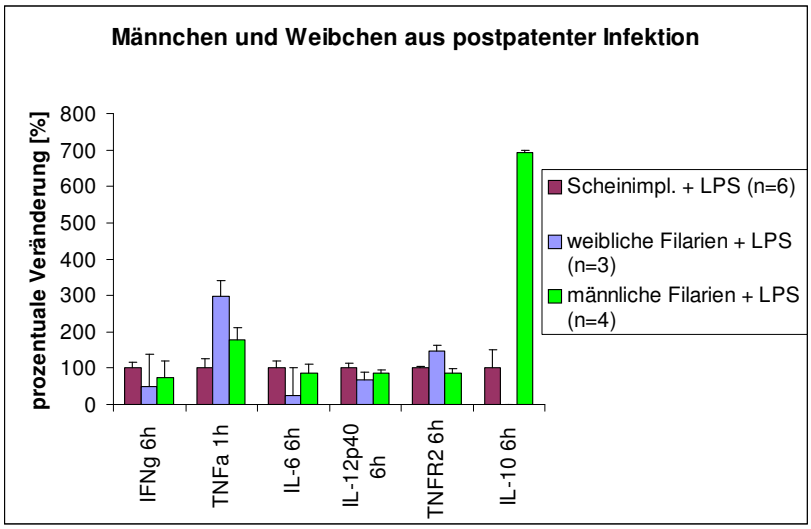


Abb.18: Zytokinausschüttung von C57BL/6-Mäusen mit männlichen bzw. weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen nach LPS-Injektion im Vergleich zu den scheinimplantierten LPS-behandelten Tieren (Scheinimpl. + LPS), deren Zytokinwerte auf 100% gesetzt wurden. Dargestellt sind die Änderungen von IFNγ, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10 6 h nach der LPS-Injektion, sowie von TNFα 1 h nach LPS-Behandlung. (aM ± SEM)

Die Implantation von männlichen oder weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen wirkte sich im Vergleich zu den scheinimplantierten Tieren sechs Stunden nach der LPS-Injektion kaum auf die Konzentration der Zytokine IFNγ, IL-6, IL-12p40 und TNFR2 aus (Abb.18). Hingegen war die TNFα-Konzentration eine Stunde nach der LPS-Injektion bei Mäusen mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen etwa verdreifacht, bei Mäusen mit männlichen Filarien knapp verdoppelt im Vergleich zu den scheinimplantierten Tieren nach LPS-Behandlung. Tiere, die männliche Filarien implantiert bekommen hatten, hatten sechs Stunden nach der LPS-Injektion siebenmal höhere IL-10-Werte als scheinimplantierte Mäuse, wohingegen bei Mäusen mit weiblichen Filarien aus postpatenten Infektionen kein IL10 gemessen werden konnte.

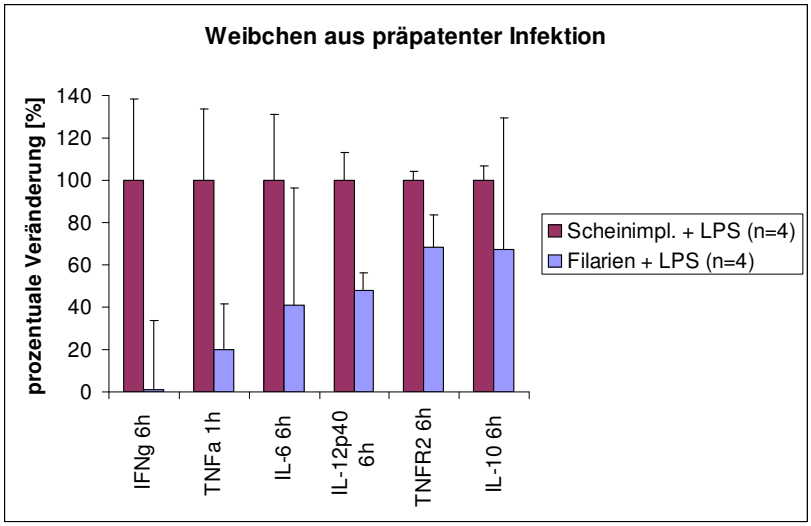


Abb.19: Zytokinausschüttung von C57BL/6-Mäusen mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen nach LPS-Injektion (Filarien + LPS) im Vergleich zu den scheinimplantierten LPS-behandelten Tieren (Scheinimpl. + LPS), deren Zytokinwerte auf 100% gesetzt wurden. Dargestellt sind die Änderungen von IFNγ, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10 6 h nach der LPS-Injektion, sowie von TNFα 1 h nach LPS-Behandlung. (aM ± SEM)

Durch eine Implantation von weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen in Mäuse konnten die durch LPS-Injektion ausgelösten T_H1-Zytokine im Vergleich zu den scheinimplantierten Mäusen reduziert werden (Abb.19). Am stärksten wurde die Konzentration von IFNγ sechs Stunden nach LPS-Injektion bei den Mäusen mit Filarien aus präpatenten Infektionen im Vergleich zu den scheinimplantierten Mäusen vermindert (etwa 1:100), aber auch die Zytokine TNFα, IL-6 und IL-12p40 wurden bei Mäusen mit Filarien aus präpatenten Infektionen deutlich vermindert im Plasma vorgefunden (1:5, 1:2,5 und 1:2). Die Konzentration des TNFR2 war sechs Stunden nach LPS-Injektion um etwa 30% geringer in Mäusen mit implantierten Filarien aus präpatenten Infektionen als bei den scheinimplantierten Kontrollen. Hingegen gab es keine eindeutigen Unterschiede in der IL-10-Konzentration zwischen diesen beiden Behandlungsgruppen.

3.1.4 Mittels Luminex ermittelte Zytokin-und Chemokinproduktion

Die Auswirkungen einer LPS-ausgelösten Sepsis wurde mittels Luminex sechs Stunden nach der i. p. LPS-Injektion (4 µg/g Körpergewicht) untersucht. Dafür wurden 32 C57BL/6-Mäuse verwendet, die einen Tag zuvor mit Mikrofilarien infiziert oder aber scheinbehandelt wurden. Eine Stunde nach der Mikrofilarieninfektion, sowie eine Stunde nach der LPS-Injektion wurde den Mäusen Blut abgenommen um die Zytokine zusätzlich im herkömmlichen ELISA zu bestimmen.

Insgesamt wurden im Luminex zwanzig Zytokine und Chemokine untersucht, wobei bereits im vorherigen Kapitel (3.1.1) bestimmte Zytokine nicht erneut abgebildet wurden.

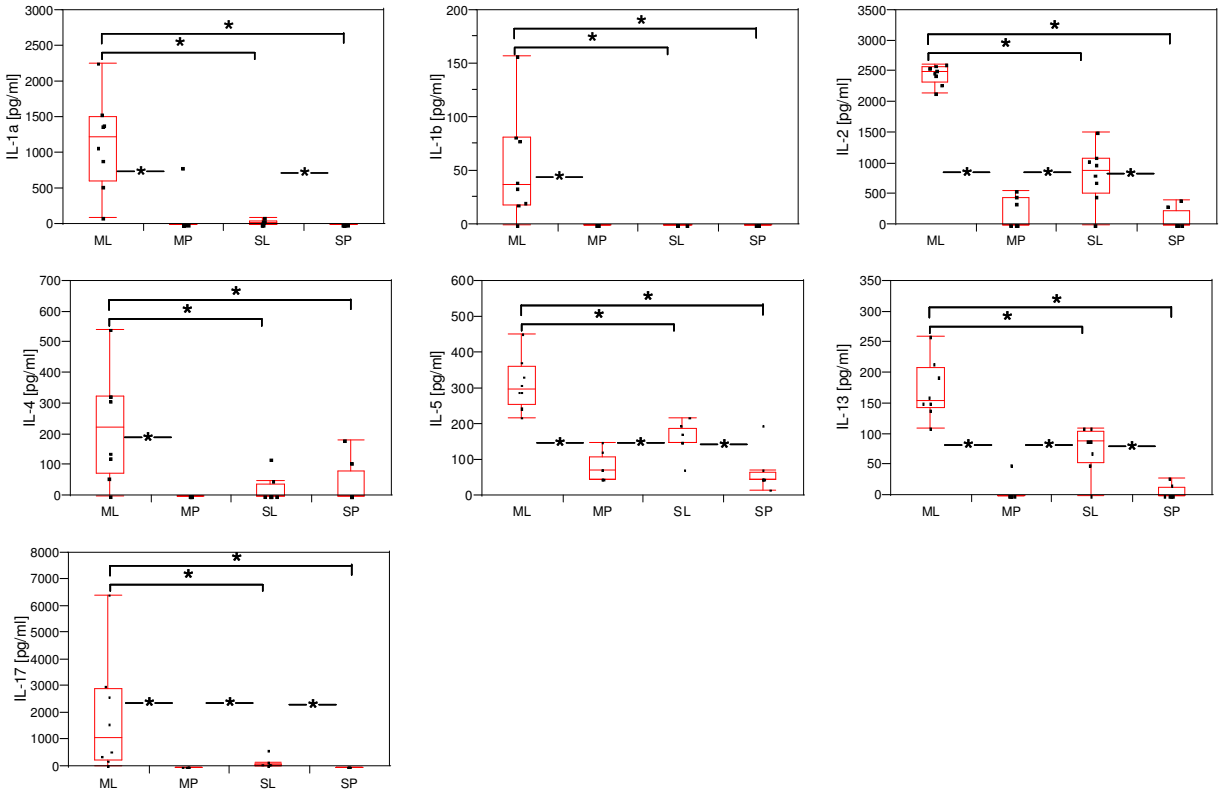


Abb.20: Zytokinkonzentrationen von C57BL/6-Mäusen 6 h nach der LPS-Injektion. ML= Mikrofilarieninfektion und LPS-Injektion (n=8), MP= Mikrofilarieninfektion und PBS-Injektion (n=8), SL= Scheinbehandlung und LPS-Injektion (n=8), SP=Scheinbehandlung und PBS-Injektion (n=8). Signifikante Unterschiede wurden mit dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05).

IL-1α wurde sechs Stunden nach der LPS-Injektion bei den Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS-Behandlung signifikant vermehrt produziert (1145±234 pg/ml) im Vergleich zu den Mäusen, die PBS erhielten oder aber scheinbehandelt und LPS-injiziert waren (Abb.20). Von den PBS-behandelten Tieren mit Scheinbehandlung hatte keines nachweisbares IL-1α im Plasma und bei den Mikrofilarien-infizierten nur eines von acht Tieren. Scheinbehandelte, LPS-injizierte Mäuse hatten im Mittel 28±11 pg/ml IL-1α und unterschieden sich damit signifikant von den scheinbehandelten, PBS-behandelten Tieren.

IL-1β konnte nur bei Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS-Injektion nachgewiesen werden (54±18 pg/ml) und war somit signifikant im Vergleich zu den drei anderen Versuchsgruppen erhöht.

Mikrofilarien-infizierte, LPS-injizierte Mäuse hatten zudem gegenüber allen anderen Versuchsgruppen signifikant erhöhte IL-2-Werte (2454±58 pg/ml). Die Injektion von LPS führte bei scheinbehandelten Tieren zu einem signifikanten Anstieg der IL-2-Konzentration (823±161 pg/ml) im Vergleich zu den PBS-injizierten scheinbehandelten (89±59 pg/ml) und Mikrofilarien-infizierten Tieren (171±86 pg/ml).

Mikrofilarien-infizierte Mäuse hatten nach der Injektion von LPS eine signifikant höhere IL-4-Konzentration (227±64 pg/ml) als die anderen Versuchsgruppen. Weder die Behandlung mit Mikrofilarien noch LPS alleine induzierte eine IL-4-Zytokinausschüttung in den Mäusen. So konnte IL-4 bei keinem der Mikrofilarien-infizierten Tiere mit PBS-Injektion und nur bei zwei von acht Tieren mit Scheinbehandlung und PBS- bzw. LPS-Injektion detektiert werden.

Die IL-5-Konzentration war sowohl in den Mikrofilarien-infizierten (313±26 pg/ml) als auch in den scheinbehandelten Mäusen (156±16 pg/ml) sechs Stunden nach der LPS-Injektion signifikant im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren erhöht (mit Scheinbehandlung 62±20 pg/ml und mit Mikrofilarien 76±14 pg/ml). Die IL-5-Konzentration bei den LPS-behandelten Mäusen mit Mikrofilarieninfektion war dabei signifikant höher als bei den scheinbehandelten Tieren mit LPS-Gabe.

Mikrofilarien-infizierte, LPS-injizierte Mäuse hatten signifikant mehr IL-13 (172±17 pg/ml) als die scheinbehandelten, LPS-injizierten Kontrollen (75±13 pg/ml). Dabei konnte IL-13 durch die Injektion von LPS induziert werden, während nur drei von 16 PBS-behandelten Tieren, unabhängig vom Infektionsstatus, nachweisbare Mengen an IL-13 hatten. Dieser Unterschied war sowohl bei Mikrofilarien-infizierten als auch bei scheinbehandelten Mäusen für den Vergleich von LPS- mit PBS-injizierten Tieren signifikant.

Eine signifikante Zunahme von IL-17 konnte bei Tieren mit Mikrofilarien- und LPS-Injektion (1846±764 pg/ml) im Vergleich zu den drei anderen Versuchsgruppen festgestellt werden. Während PBS-behandelte Tiere kein messbares IL-17 im Plasma hatten, stieg die IL-17-Konzentration bei LPS-Injektion in den scheinbehandelten Tieren demgegenüber signifikant (130±69 pg/ml) an.

Die Messungen von TNFα, IFNγ, IL-10, IL-12 und IL-6 bestätigten die Ergebnisse aus den in Kap 3.1.1 besprochenen ELISA. IFNγ und IL-12 wurden durch die alleinige Injektion von Mikrofilarien (IFNγ: 24±3 pg/ml und IL-12: 266±44 pg/ml) im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren signifikant erhöht (IFNγ: < Nachweisgrenze und IL-12: 78±9 pg/ml) und waren bei Mikrofilarien- und LPS-Injektion ebenfalls signifikant höher (IFNγ: 1786±119 pg/ml und IL-12: 38413±8571 pg/ml) als bei scheinbehandelten Tieren mit LPS-Behandlung (IFNγ: 105±16 pg/ml und IL-12: 4109±374 pg/ml). Die nach LPS-Gabe gemessenen Zytokin-Konzentrationen lagen allerdings deutlich unterhalb der im ELISA bestimmten Werte, wohingegen die PBS-Werte identisch waren.

So lagen auch die Konzentration von IL-6 und TNFα im Luminex deutlich unterhalb der ELISA-Messungen. Trotzdem wurde eine signifikante Zunahme dieser beiden Zytokine in Mäusen mit LPS- und Mikrofilarieninfektion (IL-6: 32063±1400 pg/ml und TNFα: 2659±567 pg/ml) im Vergleich zu LPS-injizierten scheinbehandelten Tieren (IL-6: 15313±2240 pg/ml und TNFα: 156±16 pg/ml) festgestellt. Bei den PBS-injizierten Tieren unterschieden sich die Mikrofilarien-infizierten nicht von den scheinbehandelten Mäusen in der TNFα- und IL-6-Konzentration. Die Messung von IL-10 stimmte sowohl quantitativ als auch qualitativ mit den Ergebnissen aus dem ELISA überein.

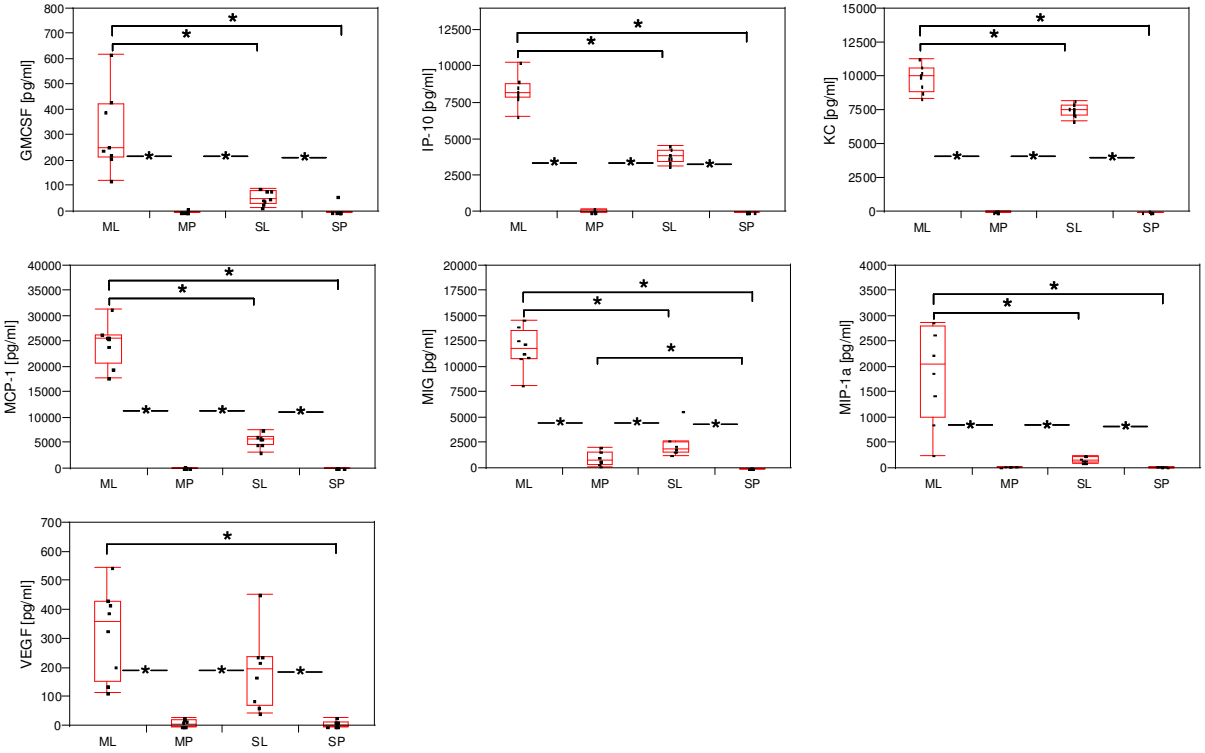


Abb.21: Chemokinkonzentrationen von C57BL/6-Mäusen 6 h nach der LPS Injektion. ML= Mikrofilarieninfektion und LPS-Injektion (n=8), MP= Mikrofilarieninfektion und PBS-Injektion (n=8), SL= Scheinbehandlung und LPS-Injektion (n=8), SP=Scheinbehandlung und PBS-Injektion (n=8). Signifikante Unterschiede wurden mit dem Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test bestimmt (*p<0,05).

GMCSF konnte bei allen Tieren mit LPS-Injektion nachgewiesen werden und unterschied sich signifikant gegenüber den Werten der PBS-behandelten Gruppen, bei denen jeweils nur bei einem von acht Tieren GMCSF messbar war (Abb.21). Zudem unterschieden sich die Mikrofilarien-infizierten (313±56 pg/ml) von den scheinbehandelten Mäusen nach LPS-Injektion (55±9 pg/ml) signifikant.

Bei den LPS-behandelten Mäusen konnte im Plasma von Mikrofilarien-infizierten Tieren signifikant mehr IP-10 detektiert werden (8333±372 pg/ml), als bei den scheinbehandelten (3840±161 pg/ml). Ebenso wurde IP-10 durch LPS signifikant im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren vermehrt gebildet. Während bei den scheinbehandelten, PBS-injizierten Mäusen kein IP-10 gemessen werden konnte, hatten drei der acht Mikrofilarien- und PBS-injizierten Tiere nachweisbare Mengen an IP-10 (50±28 pg/ml).

Die LPS-behandelten Mäuse unterschieden sich signifikant in der KC-Konzentration, wobei Mikrofilarien-infizierte Tiere mehr KC hatten (9854±346 pg/ml) als scheinbehandelte Mäuse (7498±170 pg/ml). Meist unterhalb der Nachweisgrenze war KC bei den PBS-behandelten Tieren, weshalb LPS-injizierte Mäuse signifikant mehr KC hatten.

MCP-1 wurde bei allen Tieren sechs Stunden nach der LPS-Injektion im Plasma detektiert. Dabei hatten die Mikrofilarien-infizierten, LPS-behandelten Tiere wiederum signifikant mehr MCP-1 (24638±1492 pg/ml) als die restlichen drei Gruppen. Die LPS-behandelten scheinbehandelten Tiere hatten außerdem signifikant mehr MCP-1 (5540±473 pg/ml) als die PBS-behandelten scheinbehandelten (17±3 pg/ml) oder Mikrofilarien-infizierten Tiere (44±30 pg/ml).

Bei den Mikrofilarien-infizierten Mäusen unterschieden sich sowohl die LPS- (11838±707 pg/ml) als auch die PBS-injizierten (1016±232 pg/ml) signifikant von den scheinbehandelten Tieren mit LPS- (2350±486 pg/ml) und PBS-Injektion (5±5 pg/ml) im MIG-Gehalt. Auch die Injektion von LPS führte zu einer signifikanten MIG-Zunahme im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren, sowohl bei den scheinbehandelten, als auch bei den Mikrofilarien-infizierten Mäusen.

MIP-1α konnte bei allen Tieren nachgewiesen werden. Die Mikrofilarien-infizierten, LPS-behandelten Tiere hatten dabei signifikant mehr MIP-1α (2501±821 pg/ml) als die drei anderen Behandlungsgruppen. Die LPS- und scheinbehandelten Tiere wiesen signifikant höhere MIP-1α Werte auf (176±22 pg/ml) als die PBS-injizierten scheinbehandelten (28±4 pg/ml) oder Mikrofilarien-infizierten Tiere (28±3 pg/ml).

Die Injektion von LPS erhöhte signifikant die VEGF-Konzentration im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede nach LPS-Injektion zwischen Mikrofilarien-infizierten (322±55 pg/ml) und scheinbehandelten Tieren (190±47 pg/ml). Bei den PBS-behandelten Mäusen konnten bei 50% der Mäuse geringe Werte an VEGF gemessen werden (mit Mikrofilarien 10±4 pg/ml, scheinbehandelt 8±4 pg/ml).

Die Konzentrationen von FGF (Mittelwerte zwischen 113-373 pg/ml) unterschieden sich bei keiner der verschiedenen Behandlungsgruppen signifikant voneinander (ohne Abbildung).

3.1.5 Überlebensrate

Die Überlebensrate wurde über 48 Stunden nach der Injektion von LPS bestimmt. Nach diesem Zeitpunkt verstarb kein Tier mehr an den Folgen der LPS-Injektion.

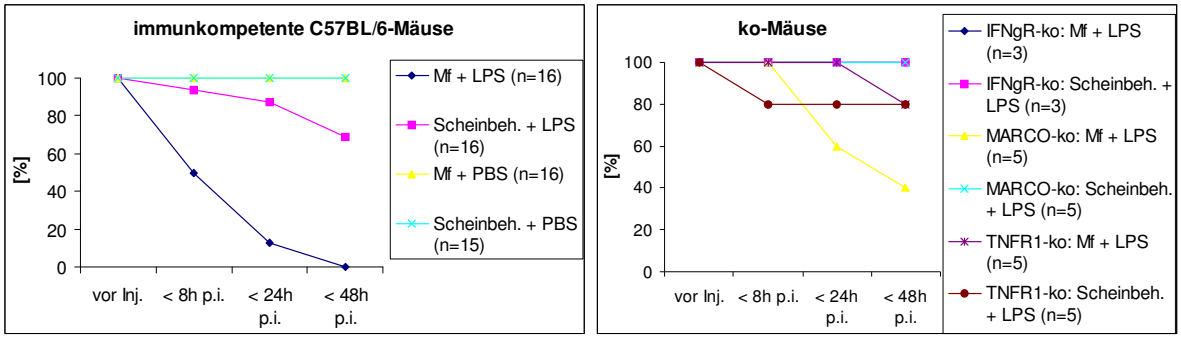


Abb.22: Überlebensrate von C57BL/6-Mäusen (links) und IFNγR-ko-, MARCO-ko- und TNFR1-ko-Mäusen (rechts) vor (vor Inj.), bzw. bis 8 (<8h p.i.), 24 (<24h p.i.) oder 48 h (<48h p.i.) nach der Injektion von LPS oder PBS. Die Tiere waren entweder scheinbehandelt (Scheinbeh.) oder hatten Mikrofilarien (Mf) bekommen.

Alle C57BL/6-Mäuse, die Mikrofilarien infiziert und mit LPS behandelt worden waren, starben innerhalb von 48 Stunden nach der LPS-Injektion (Abb.22, links). Bereits acht Stunden nach der LPS-Gabe starben 50% dieser Tiere und innerhalb von 24 Stunden 14 der 16 Versuchstiere (87,5%). Hingegen starben nur fünf der 16 scheinbehandelten Kontrolltiere (ca. 32%) innerhalb von 48 Stunden nach der LPS-Injektion. Acht Stunden nach der LPS-Injektion war dies eins, innerhalb von 24 Stunden zwei der 16 scheinbehandelten LPS-behandelten Tiere. Zu späteren Zeitpunkten starben keine weiteren Mäuse mehr. Alle Kontrolltiere, die PBS injiziert bekamen, überlebten den Versuch, unabhängig davon ob sie Mikrofilarien oder eine Scheinbehandlung erhalten hatten.

Alle IFNγR-ko-Mäuse mit LPS-Injektion, sowohl die Scheinbehandelten als auch Mikrofilarien-infizierten, überlebten den Sepsisversuch (Abb.22, rechts). Von den TNFR1-ko-Mäusen überlebten sowohl bei den Mikrofilarien-infizierten als auch bei scheinbehandelten Tieren alle bis auf jeweils eine Maus (4 von 5 Tieren) die LPS-Injektion. Hingegen starben von den MARCO-ko-Mäusen drei der fünf Tiere mit Mikrofilarien und LPS-Injektion innerhalb von 48 Stunden, wobei zwei davon in den ersten 24 Stunden starben. Die MARCO-ko-Mäuse, die scheinbehandelt waren und LPS bekommen hatten, überlebten alle den Sepsisversuch.

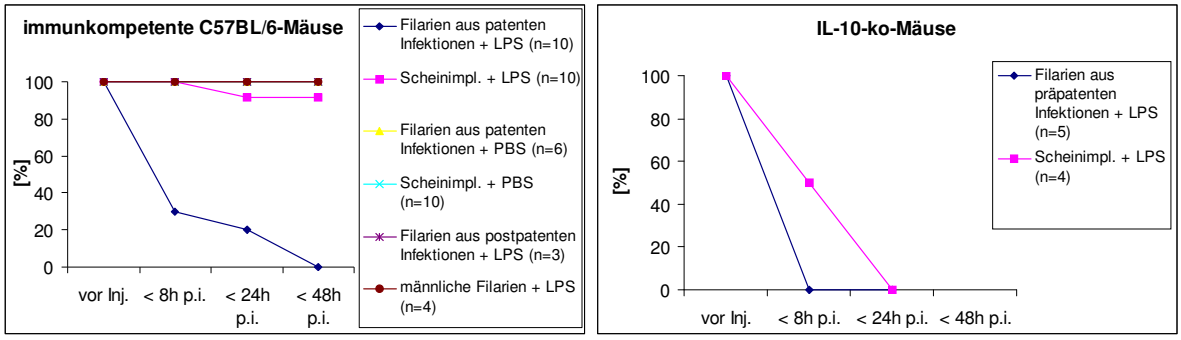


Abb.23: Überlebensrate von C57BL/6-Mäusen (links) und IL-10-ko-Mäusen (rechts) vor (vor Inj.), bzw. bis 8 (<8h p.i.), 24 (<24h p.i.) oder 48 h (<48h p.i.) nach der Injektion von LPS oder PBS. Die Tiere waren entweder scheinimplantiert (Scheinimpl.) oder hatten männliche oder weibliche Filarien (aus präpatenten, patenten oder postpatenten Infektionen) implantiert bekommen.

Von den C57BL/6-Mäusen, die weibliche Filarien aus patenten Infektionen implantiert bekommen hatten und bei denen somit Mikrofilarien im peripheren Blut nachweisbar waren, starben alle Tiere nach LPS-Injektion innerhalb von 48 Stunden (Abb.23, links). Bereits acht Stunden nach der LPS-Injektion starben sieben der zehn Tiere, die drei anderen Tiere starben zwischen 24-48 Stunden nach der LPS-Behandlung. Alle Tiere, die weibliche Filarien aus postpatenten Infektionen oder aber männliche Filarien implantiert hatten, überlebten die Injektion von LPS. Von den zehn scheinimplantierten Kontrollen starb ein Tier innerhalb von 24 Stunden nach der LPS-Injektion. Alle Tiere mit PBS-Injektion überlebten den Versuch.
Die IL-10-ko-Mäuse starben alle nach der LPS-Injektion (Abb.23, rechts). Die IL-10-ko-Mäuse, die weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen implantiert hatten starben dabei alle innerhalb von acht Stunden, bei den scheinbehandelten Tieren starb die Hälfte bereits ebenfalls nach acht Stunden, die beiden anderen innerhalb von 24 Stunden nach der LPS-Injektion.

3.1.6 Zellpopulationen und Ig-Konzentration

Der Einfluss von Mikrofilarien auf eine LPS-induzierte Sepsis in C57BL/6-Mäusen wurde anhand der Veränderung der Zellpopulationen sowie der Immunglobuline im peripheren Blut sechs Stunden nach LPS- bzw. PBS-Injektion bestimmt. Als Kontrollen dienten Tiere mit Scheinbehandlung sowie PBS-Injektion. Die Mikrofilarieninfektion bzw. die Scheinbehandlung fand einen Tag vor der LPS-Injektion statt.
Aufgrund der benötigten großen Menge an Blut handelte es sich dabei um einen gesonderten Versuch, so dass kein weiteres Blut für Zytokinbestimmungen oder ähnliches entnommen wurde, damit eine Verfälschung der Ergebnisse durch übermäßige Blutentnahme ausgeschlossen werden konnte.

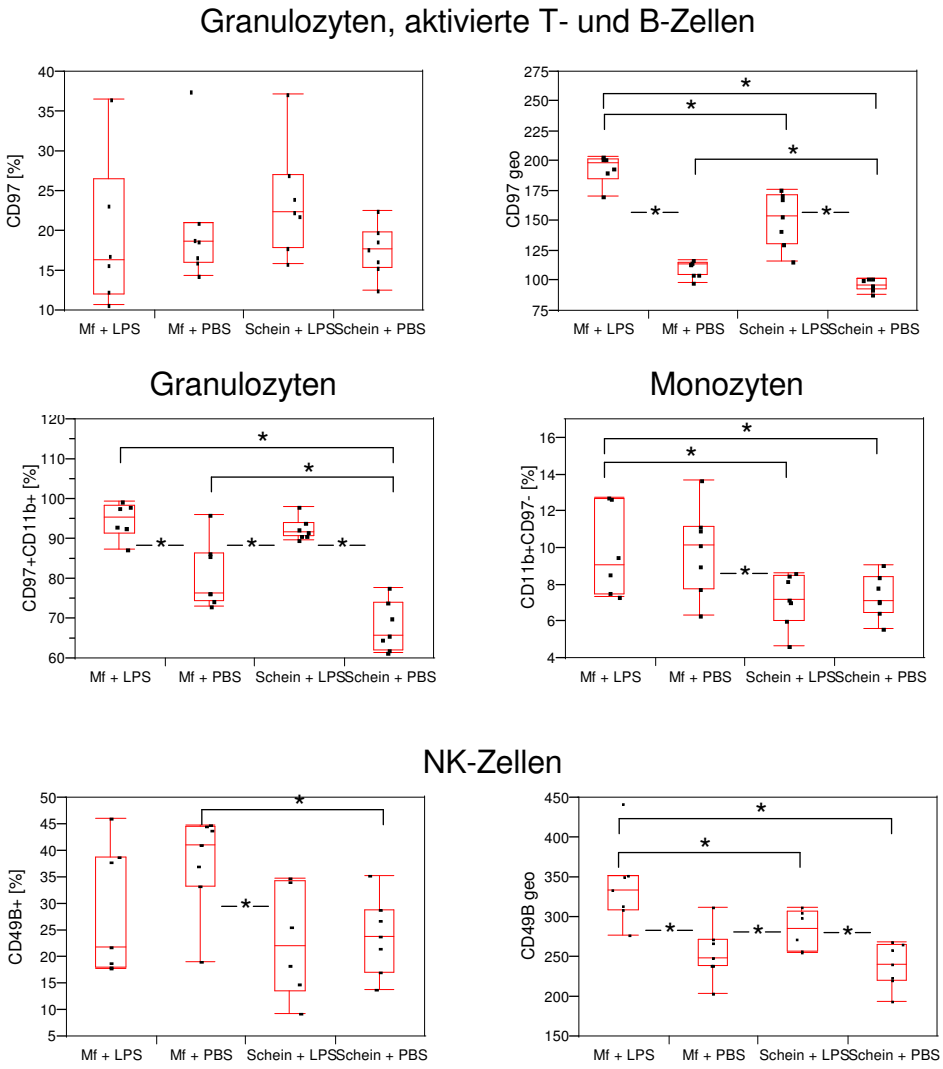


Abb.24: Zellpopulationen im peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen, die Mikrofilarien und LPS (Mf + LPS, n=7) bzw. Mikrofilarien und PBS (Mf + PBS, n=7) bekamen, und die dazugehörigen Scheinbehandlungen (Schein + LPS, n=7 sowie Schein + PBS, n=7). Signifikante Unterschiede wurden nach Stabilisierung der Daten durch Arcsinus-Transformation (arcsin [Quadratwurzel der Werte in % / 100]) nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Das Vorkommen von $CD97^+$-Zellen, Granulozyten sowie aktivierten T- und B-Zellen, war bei den verschiedenen Versuchsgruppen, d. h. Mäusen mit Mikrofilarien und LPS-Injektion, Mäusen mit Scheinbehandlung und LPS-Injektion, Mäusen mit Mikrofilarien und PBS-Injektion und Mäusen mit Scheinbehandlung zuzüglich PBS-Gabe, gleichmäßig (Abb.24).

Hingegen gab es signifikante Unterschiede bei der Dichte der CD97-Marker auf der Zelloberfläche. So hatten die LPS-behandelten Tiere mit Mikrofilarieninfektion signifikant mehr CD97 auf ihrer Zelloberfläche exprimiert, als die anderen Gruppen. Außerdem hatten Mikrofilarien-infizierte Mäuse nach PBS-Gabe ebenfalls signifikant mehr CD97-Oberflächenmarker auf ihren Zellen als die scheinbehandelten PBS-Kontrollen. Die Injektion von LPS führte zu einem generellen Anstieg der CD97-Marker an der Zelloberfläche verglichen mit den PBS-behandelten Tieren.

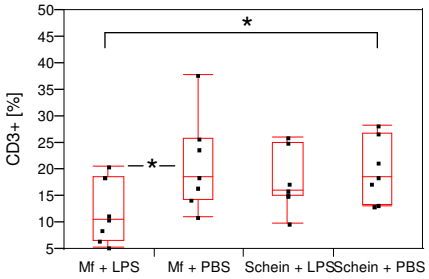
Entsprechend der Dichte des CD97-Oberflächenmarkers bei den verschieden behandelten Versuchsgruppen verhielten sich die $CD97^+CD11b^+$-Granulozyten. Die Injektion von LPS führte zu einer signifikanten Zunahme der $CD97^+CD11b^+$-Granulozyten bei Mikrofilarien-infizierten und scheinbehandelten Mäusen, im Vergleich zu den PBS-Kontrollen. Eine Infektion mit Mikrofilarien erhöhte die Zellzahl von $CD97^+CD11b^+$-Granulozyten signifikant im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen, wenn beide Gruppen PBS erhielten.

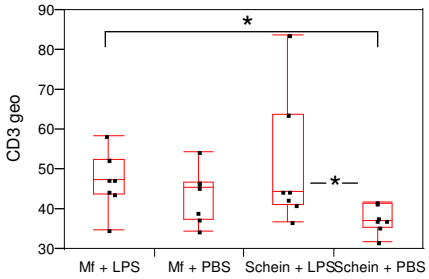
Ebenfalls signifikant erhöht wurde die Anzahl von $CD11b^+CD97^-$-Monozyten bei LPS-Injektion in Mikrofilarien-infizierten Mäusen im Vergleich zu den scheinbehandelten Kontrollen mit LPS- oder PBS-Injektion. Mikrofilarien-infizierte Mäuse mit PBS-Injektion unterschieden zudem signifikant von den scheinbehandelten Tieren mit LPS-Injektion. Die Anzahl der $CD11b^+CD97^-$-Monozyten veränderte sich durch die LPS-Injektion nicht.

$CD49B^+$-NK-Zellen kamen nur bei Mikrofilarien-infizierten Tieren mit PBS-Injektion im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren mit LPS- wie auch mit PBS-Injektion signifikant vermehrt vor.

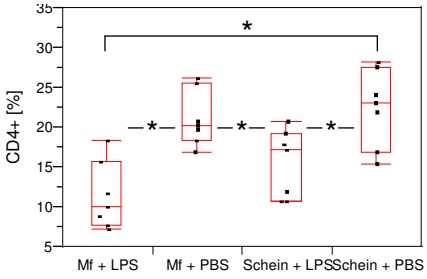
Die Dichte der CD49B-Marker auf den Zellen war jedoch bei Tieren mit Mikrofilarieninfektion und LPS-Gabe am höchsten und unterschied sich signifikant von den anderen Gruppen. Aber auch die Injektion von LPS führte unabhängig von der Mikrofilarieninfektion oder Scheinbehandlung zu einer signifikanten Zunahme der CD49B-Marker auf der Zelloberfläche verglichen zu den PBS-behandelten Tieren.

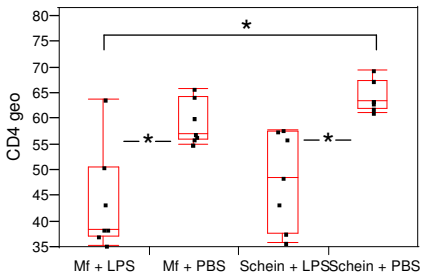
T-Zellen



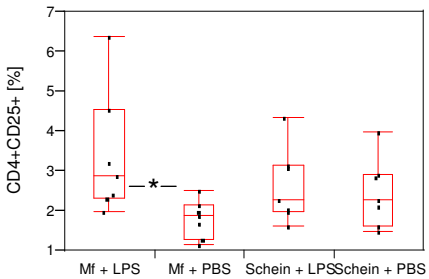


T_H-Zellen

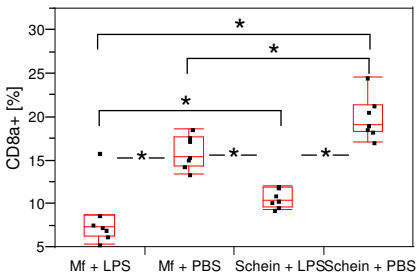


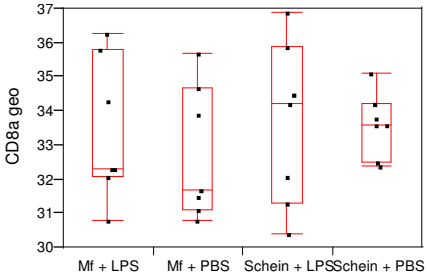


$CD4^+CD25^+$ T-Zellen

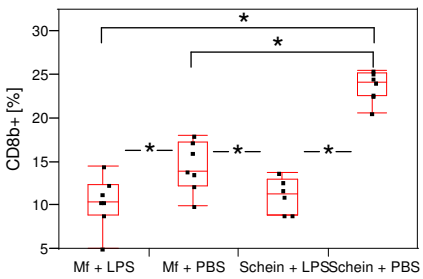


zytotoxische T-Zellen $CD8a^+$





Zytotoxische T-Zellen CD8b+



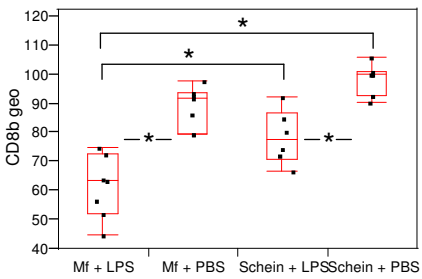


Abb.25: Zellpopulationen im peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen, die Mikrofilarien und LPS (Mf + LPS, n=7) bzw. Mikrofilarien und PBS (Mf + PBS, n=7) bekamen, und die dazugehörigen Scheinbehandlungen (Schein + LPS, n=7 sowie Schein + PBS, n=7). Signifikante Unterschiede wurden nach Stabilisierung der Daten durch Arcsinus-Transformation (arcsin [Quadratwurzel der Werte in % / 100]) nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Die Anzahl der $CD3^+$-T-Zellen war bei Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS-Injektion am geringsten und unterschied sich signifikant von den Werten der PBS-behandelten Versuchsgruppen (Abb.25). Im Gegensatz dazu zeigten die LPS-behandelten Versuchsgruppen eine signifikant höhere Dichte des CD3-Markers auf ihrer Zelloberfläche verglichen mit den scheinbehandelten PBS-Kontrollen.

Die Prozentzahl der $CD4^+$-T-Zellen im peripheren Blut, sowie die Expression der CD4-Marker auf der Zelloberfläche, waren bei Tieren mit LPS-Injektion am geringsten und unterschieden sich signifikant von den PBS-behandelten Gruppen.

$CD4^+CD25^+$-Zellen kamen nur in der Gruppe LPS-behandelter Mikrofilarien-infizierter Tiere verglichen mit PBS-behandelten Mikrofilarien-infizierten Mäusen signifikant vermehrt vor.

Während der CD8a-Oberflächenmarker, der auf zytotoxischen T-Zellen vorkommt, bei allen Behandlungsgruppen gleichmäßig exprimiert wurde, supprimierte sowohl die Infektion mit Mikrofilarien, als auch die Injektion von LPS die Anzahl $CD8a^+$-Zellen im peripheren Blut signifikant. So hatten Mikrofilarien-infizierte, LPS-behandelte Mäuse signifikant weniger $CD8a^+$-Zellen als die drei anderen Behandlungsgruppen. Scheinbehandelte LPS-behandelte Tiere hatten ebenfalls signifikant weniger zytotoxische $CD8a^+$-Zellen als die PBS-behandelten Versuchsgruppen. Mikrofilarien-positive PBS-injizierte Tiere wiesen zudem im Vergleich zu den PBS-behandelten scheinbehandelten Mäusen eine signifikante Verringerung der $CD8a^+$-Zellen auf.

$CD8b^+$-Zellen wurden in den Mäusen durch die Injektion von LPS signifikant im Vergleich zu den Mäusen mit PBS-Injektion verringert, wobei dies unabhängig vom Infektionsstatus war. Die meisten $CD8b^+$-Zellen kamen bei scheinbehandelten Tieren mit PBS-Injektion vor, die sich signifikant von den drei weiteren Versuchsgruppen unterschieden. Mikrofilarien-positive Tiere nach PBS-Injektion hatten dabei ebenfalls signifikant mehr $CD8b^+$-Zellen im peripheren Blut als die LPS-behandelten Gruppen.

Die Dichte von CD8b auf der Zelloberfläche war ebenfalls bei Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS-Injektion im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant verringert. Ansonsten unterschieden sich die scheinbehandelten Tiere voneinander signifikant, wobei die LPS-injizierten Tiere eine geringere Dichte von CD8b hatten als die PBS-behandelten.

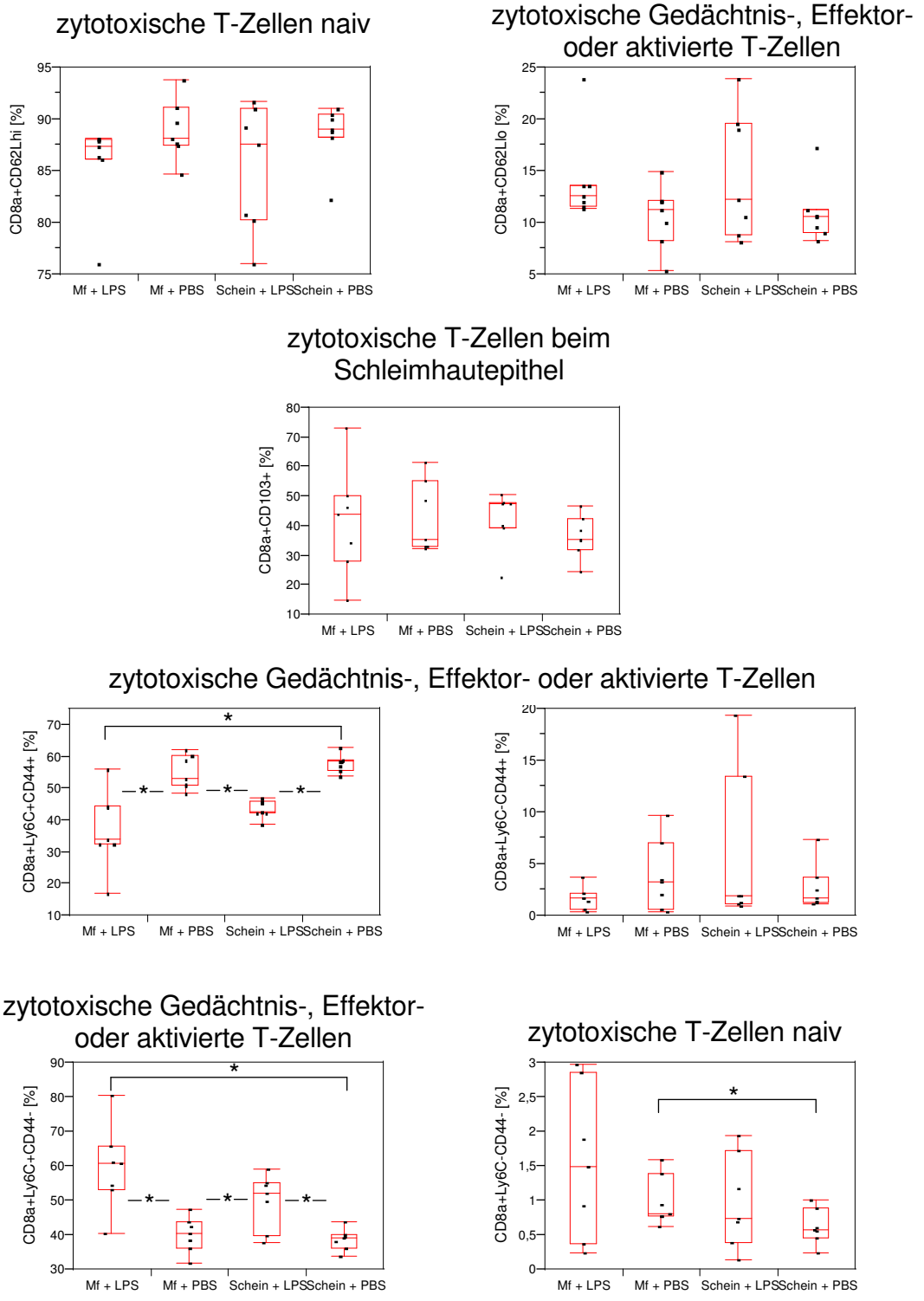


Abb.26: Zellpopulationen im peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen, die Mikrofilarien und LPS (Mf + LPS, n=7) bzw. Mikrofilarien und PBS (Mf + PBS, n=7) bekamen, und die dazugehörigen Scheinbehandlungen (Schein + LPS, n=7 sowie Schein + PBS, n=7). Signifikante Unterschiede wurden nach Stabilisierung der Daten durch Arcsinus-Transformation (arcsin [Quadratwurzel der Werte in % / 100]) nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Naive zytotoxische $CD8a^+CD62Lhi$-T-Zellen waren ebenso wie zytotoxische Gedächtnis-, Effektor- oder aktivierte $CD8a^+CD62Llo$-T-Zellen und zytotoxische $CD8a^+CD103^+$-T-Zellen, bei allen Behandlungsgruppen gleichmäßig vorhanden (Abb.26).

Zytotoxische Gedächtnis-, Effektor- oder aktivierte $CD8a^+Ly6C^+$-T-Zellen waren bei einer Co-Expression von $CD44^+$, verglichen zu den PBS-behandelten Gruppen, signifikant durch eine LPS-Injektion vermindert. Die Injektion von Mikrofilarien zeigte dabei keine Unterschiede im Vergleich zu den Scheinbehandlungen. Für $CD8a^+Ly6C^+CD44^-$-Zellen war dieses Verhältnis dementsprechend umgekehrt, mit einer höheren Anzahl von $CD8a^+Ly6C^+CD44^-$-T-Zellen bei LPS-behandelten Tieren.

Naive zytotoxische $CD8a^+Ly6C^-CD44^-$-T-Zellen waren bei Mikrofilarien-infizierten, PBS-behandelten Tieren verglichen zu scheinbehandelten, PBS-injizierten Tieren signifikant erhöht. Die anderen Behandlungsgruppen wiesen untereinander keine signifikanten Unterschiede bei $CD8a^+Ly6C^-CD44^-$-Zellen auf.

Die unterschiedliche Behandlung der Mäuse wirkte sich nicht auf das Vorkommen von zytotoxischen $CD8a^+Ly6C^-CD44^+$- Gedächtnis-, Effektor-, oder aktivierten T-Zellen aus.

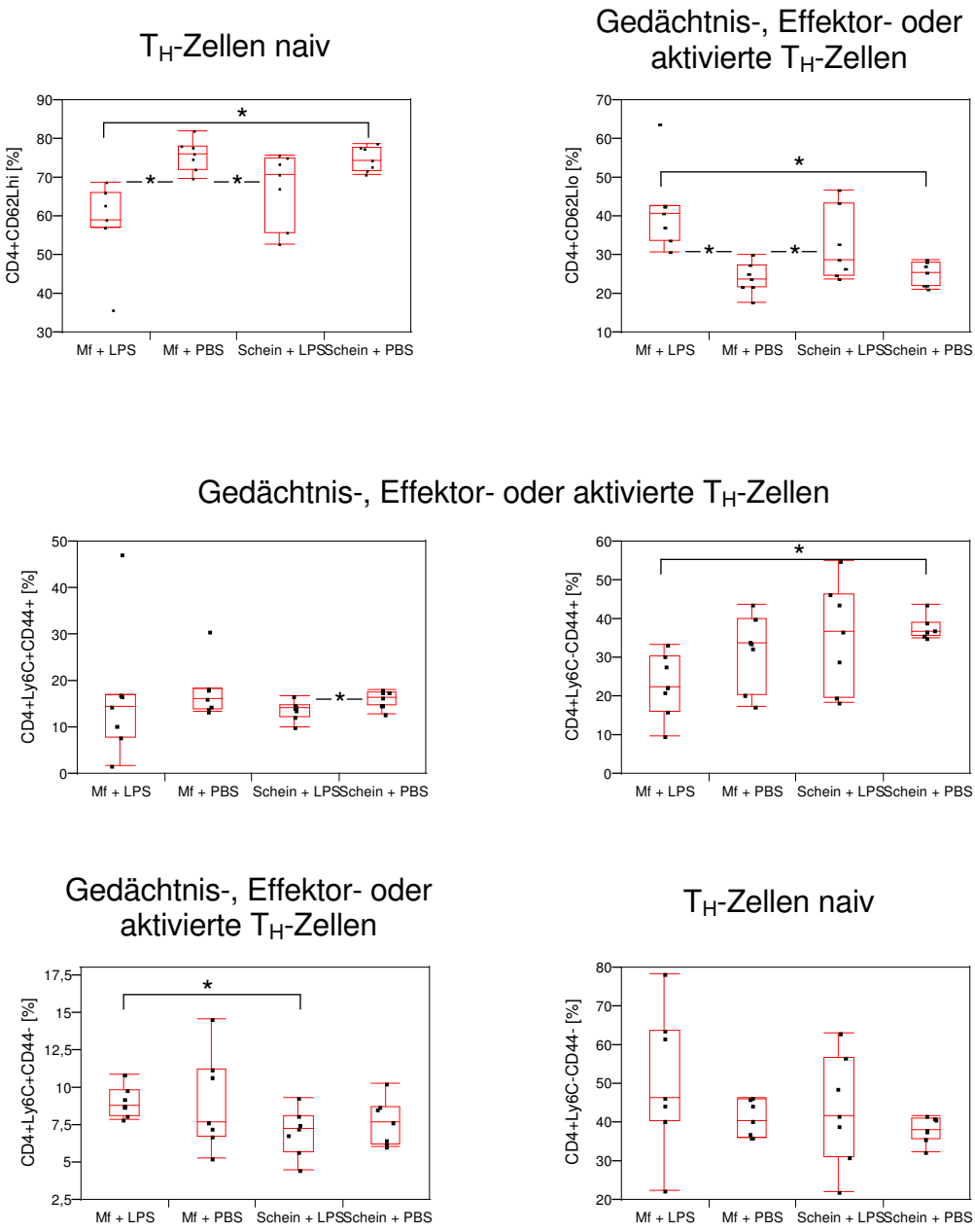


Abb.27: Zellpopulationen im peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen, die Mikrofilarien und LPS (Mf + LPS, n=7) bzw. Mikrofilarien und PBS (Mf + PBS, n=7) bekamen, und die dazugehörigen Scheinbehandlungen (Schein + LPS, n=7 sowie Schein + PBS, n=7). Signifikante Unterschiede wurden nach Stabilisierung der Daten durch Arcsinus-Transformation (arcsin [Quadratwurzel der Werte in % / 100]) nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Naive $CD4^+CD62Lhi$-T_H-Zellen waren bei Mikrofilarien-positiven Tieren mit LPS-Injektion signifikant vermindert im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren, unabhängig davon, ob diese Mikrofilarien infiziert bekommen hatten oder scheinbehandelt waren (Abb.27). Mikrofilarien-positive Tiere mit PBS-Injektion hatten signifikant mehr naive $CD4^+CD62Lhi$-T_H-Zellen als scheinbehandelte Tiere mit LPS-Injektion, unterschieden sich allerdings nicht eindeutig von den Tieren mit PBS-Gabe und Scheinbehandlung.

Im Gegensatz dazu waren die Gedächtnis-, Effektor- oder aktivierte $CD4^+CD62Llo$-T_H-Zellen bei den LPS-behandelten Tieren häufiger im peripheren Blut zu finden als bei Tieren mit PBS-Injektion. Tiere mit Mikrofilarieninfektion und LPS-Injektion unterschieden sich dabei signifikant von den scheinbehandelten Tieren, die PBS erhielten. Tiere mit Mikrofilarien und PBS-Injektion hatten signifikant weniger $CD4^+CD62Llo$-Zellen als die beiden mit LPS behandelten Gruppen.

Die Untersuchung von Gedächtnis-, Effektor-, oder aktivierten $CD4^+Ly6CCD44$-T_H-Zellen ergab nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Mikrofilarien-positive, LPS-behandelte Tiere wiesen signifikant mehr $CD4^+Ly6C^+CD44^-$-Zellen auf, als scheinbehandelte Tiere mit LPS-Injektion, aber signifikant weniger $CD4^+Ly6C^-CD44^+$-Zellen als scheinbehandelte Tiere mit PBS-Injektion. $CD4^+Ly6C^+CD44^+$-Zellen waren bei scheinbehandelten Tieren mit LPS-Injektion signifikant verringert verglichen mit scheinbehandelten Tieren mit PBS-Injektion. Die Anzahl $CD4^+Ly6C^-CD44^-$-Zellen unterschied sich nicht signifikant bei den Tieren der vier verschiedenen Gruppen.

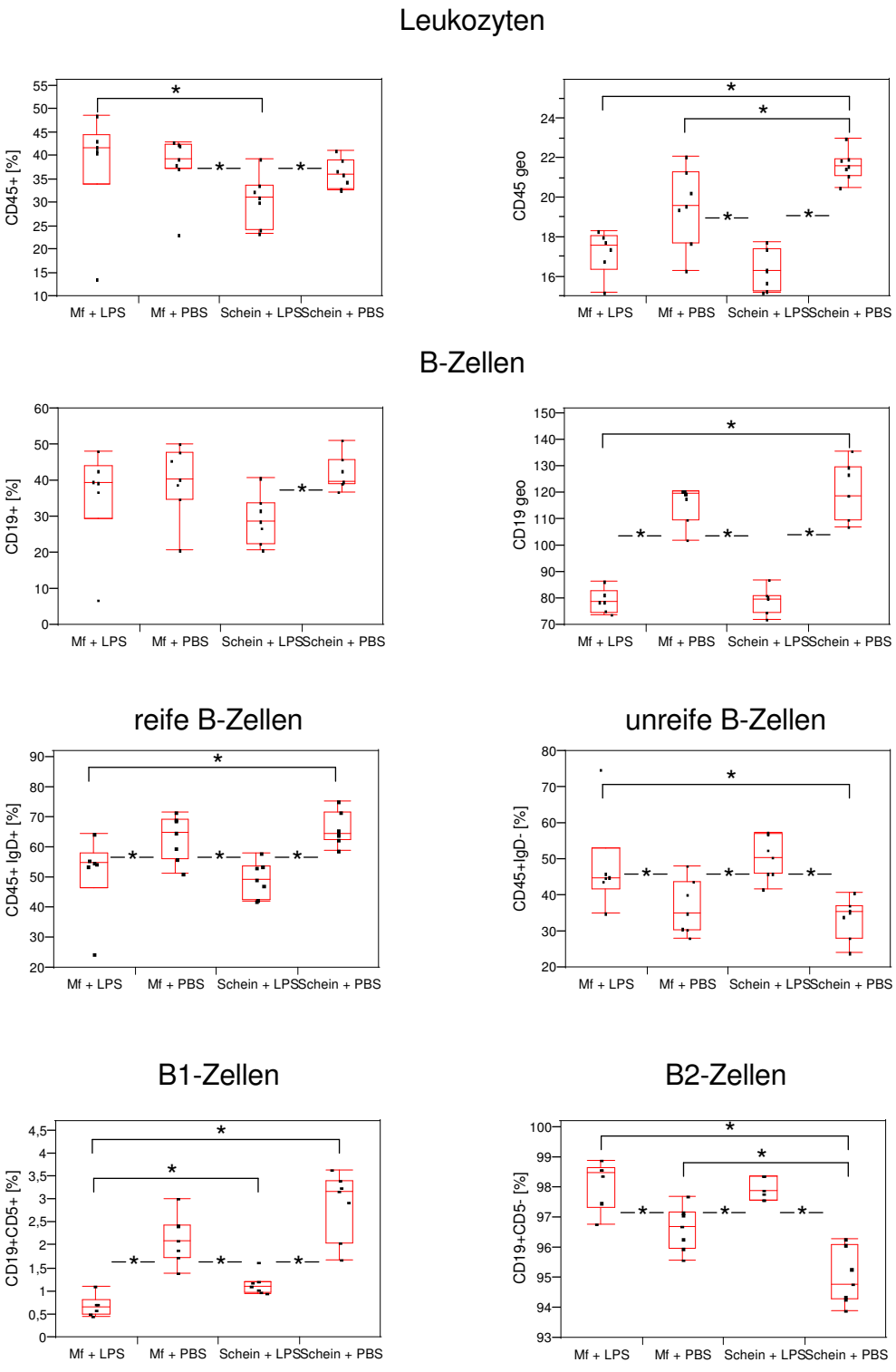


Abb.28: Zellpopulationen im peripheren Blut von C57BL/6-Mäusen, die Mikrofilarien und LPS (Mf + LPS, n=7) bzw. Mikrofilarien und PBS (Mf + PBS, n=7) bekamen, und die dazugehörigen Scheinbehandlungen (Schein + LPS, n=7 sowie Schein + PBS, n=7). Signifikante Unterschiede wurden nach Stabilisierung der Daten durch Arcsinus-Transformation (arcsin [Quadratwurzel der Werte in % / 100]) nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Die meisten $CD45^+$-Leukozyten kamen bei Mikrofilarien-infizierten Tieren mit LPS-Injektion vor und waren signifikant häufiger im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren, die ebenfalls LPS erhielten (Abb.28). Diese scheinbehandelten LPS-behandelten Tiere hatten zudem signifikant weniger $CD45^+$-Zellen als die Tiere mit PBS-Injektion, unabhängig davon, ob sie Mikrofilarien-infiziert oder scheinbehandelt waren.

Die Dichte der CD45-Marker auf der Zelloberfläche wurde, unabhängig vom Infektionsstatus, durch eine LPS-Injektion signifikant im Vergleich zu den scheinbehandelten PBS-injizierten Tieren verringert. Mikrofilarien-positive, PBS-behandelte Mäuse wiesen ebenfalls eine höhere Dichte von CD45 auf, als scheinbehandelte Tiere mit LPS-Injektion.

Mikrofilarien-infizierte Mäuse mit PBS- oder LPS-Injektion zeigten keinen Unterschied im Vorkommen von $CD19^+$-B-Zellen. $CD19^+$-B-Zellen waren hingegen bei scheinbehandelten LPS-injizierten Tieren im Vergleich zu scheinbehandelten PBS-injizierten Mäusen signifikant verringert.

Wurde jedoch die Dichte des CD19-Markers auf den B-Zellen betrachtet, fiel auf, dass die LPS-injizierten Mäuse, unabhängig vom Infektionsstatus, eine signifikant geringere Dichte dieses Markers zeigten als die PBS-behandelten Tiere.

Die LPS-injizierten Tiere zeichneten sich zudem im Vergleich zu den PBS-injizierten Mäusen durch einen signifikant geringeren Prozentsatz von reifen $CD45^+IgD^+$-B-Zellen aus, wobei dies wiederum unabhängig vom Infektionsstatus war. Dementsprechend waren unreife $CD45^+IgD^-$-B-Zellen bei LPS-behandelten Tieren im Vergleich zu PBS-Kontrollen signifikant erhöht.

$CD19^+CD5^+$-B1-Zellen waren bei Mikrofilarien-infizierten Mäusen nach LPS-Injektion am geringsten vorhanden und unterschieden sich von den drei anderen Behandlungsgruppen signifikant. PBS-behandelte Mikrofilarien-infizierte und scheinbehandelte Tiere hatten signifikant mehr $CD19^+CD5^+$-B1-Zellen als die scheinbehandelten LPS-injizierten Tiere.

Hingegen waren $CD19^+CD5^-$-B2-Zellen bei Mikrofilarien-infizierten und scheinbehandelten Mäusen mit LPS-Injektion am häufigsten vertreten und unterschieden sich signifikant von den PBS-behandelten Versuchsgruppen. Mikrofilarien-infizierte Tiere mit PBS-Injektion hatten zudem signifikant mehr $CD19^+CD5^-$-B2-Zellen als die scheinbehandelte PBS-injizierte Gruppe.

Parallel zur Zellanalyse wurden von denselben Tieren die Immunglobuline gemessen.

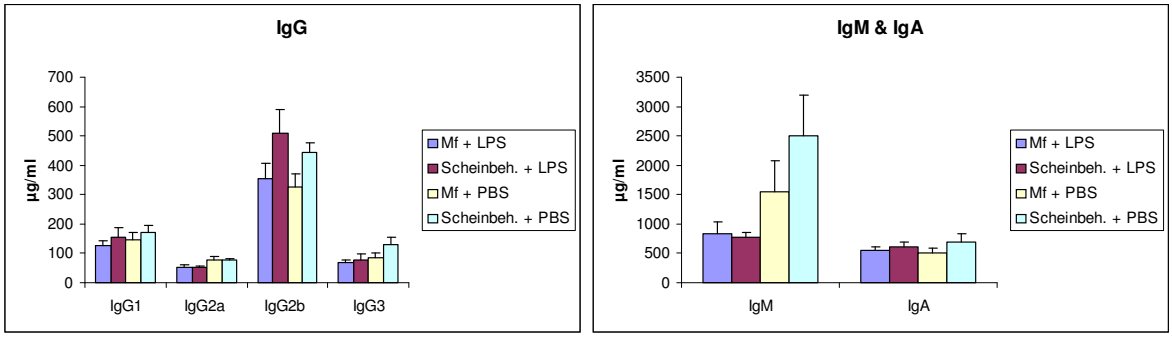


Abb.29: Immunglobulin(Ig)-Analyse von C57BL/6-Mäusen 6 h nach der Injektion von PBS oder LPS, wobei die Tiere einen Tag zuvor Mikrofilarien (Mf) oder eine Scheinbehandlung (Scheinbeh.) erhalten hatten. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die Messung der Immunglobuline erfolgte sechs Stunden nach PBS- bzw. LPS-Injektion, wobei die Tiere einen Tag zuvor Mikrofilarien bzw. eine Scheinbehandlung erhalten hatten. Dabei traten weder bei den gemessenen IgG-Subklassen (IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3) noch bei IgM oder IgA signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Tieren auf (Abb.29).

3.1.7 Verlauf der Körpertemperatur

Die Körpertemperatur wurde sechs Stunden nach der LPS-Injektion gemessen, wobei den Mäusen für die Zytokinbestimmung dreimal Plasma entnommen wurde. Als Kontrolle dienten für die Mikrofilarien-Experimente unbehandelte Tiere, denen kein Blut abgenommen wurde. Die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe ist in Tab. 6 angegeben. Die Mikrofilarieninfektion bzw. Scheinbehandlung fand einen Tag vor der LPS-Injektion statt.

Bei den Tieren, die adulte Filarien implantiert bekommen hatten und deren Kontrollen, wurde direkt vor der Injektion von LPS die Temperatur gemessen. Die zweite Temperaturmessung erfolgte sechs Stunden nach der LPS Injektion. Bei diesen Tieren wurde ebenfalls dreimal Blut zur Zytokinbestimung abgenommen.

	C57BL/6	IFNγR-ko	MARCO-ko	TNFR1-ko
unbehandelt	6	7	9	8
Mikrofilarien + LPS	8	3	5	5
Scheinbeh. + LPS	8	3	5	5
Mikrofilarien + PBS	8	1	3	3
Scheinbeh. + PBS	8	-	3	2

Tab.6: Anzahl der zur Temperaturmessung verwendeten Tiere. Verwendet wurden C57BL/6, IFNγR-ko-, MARCO-ko- und TNFR1-ko-Mäuse, die Mikrofilarien infiziert bekamen oder scheinbehandelt (scheinbeh.)waren. Die Tiere bekamen LPS oder PBS injiziert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere.

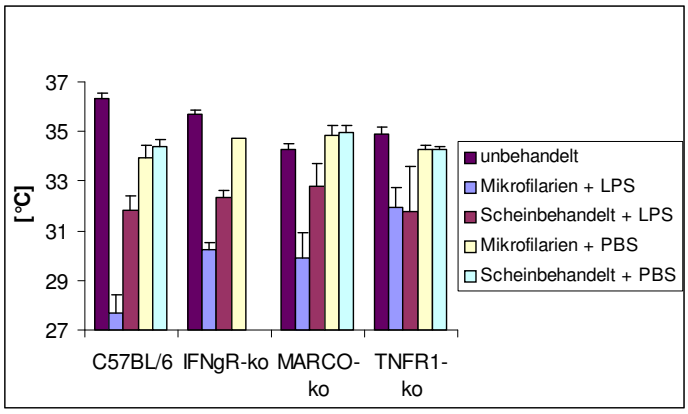


Abb.30: Temperatur 6 h nach der Injektion von LPS oder PBS bei C57BL/6, IFNγR-ko-, MARCO-ko- und TNFR1-ko-Mäusen. Als Kontrolle (unbehandelt) dienten Tiere, die nicht am Versuch teilnahmen und denen auch kein Blut abgenommen wurde. Die restlichen Mäuse wurden einen Tag zuvor mit Mikrofilarien infiziert oder sie erhielten eine Scheinbehandlung. Signifikante Veränderungen sind nicht dargestellt. (aM ± SEM)

Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten die Mikrofilarien-infizierten C57BL/6-Mäuse signifikant niedrigere Temperaturen (27,7±0,7°C) als die C57BL/6-Mäuse anderer Behandlung. Die Mikrofilarien-infizierten Mäuse der ko-Stämme hatten nach der LPS-Behandlung im Vergleich zu den immunkompetenten C57BL/6-Mäusen höhere Temperaturwerte. MARCO-ko- und IFNγR-ko-Mäuse hatten eine deutlich niedrigere Temperatur (29,9±1,0°C und 30,2±0,3°C) als die entsprechenden scheinbehandelten LPS-Kontrollen. Bei den LPS-injizierten TNFR1-ko-Mäusen wirkte sich die Injektion von Mikrofilarien nicht auf die Temperatur aus (32,0±0,8°C).

Die Injektion von LPS führte ebenfalls bei allen scheinbehandelten Mäusen zu einer deutlichen Temperaturabnahme im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. C57BL/6-Mäuse und TNFR1-ko-Mäuse hatten dabei etwa gleich niedere Temperaturen mit 31,9±0,6°C und 31,8±1,8°C,

die Temperatur von MARCO-ko- und IFNγR-ko-Mäusen war dagegen leicht höher (32,8±0,9°C und 32,4±0,3°C).

Die Temperatur der unbehandelten Tiere betrug bei C57BL/6-Mäusen 36,3±0,2°C und war bei den ko-Mäusen mit 34,2±0,2°C (MARCO-ko), 34,9±0,3°C (TNFR1-ko) und 35,7±0,2°C (IFNγR-ko) etwas geringer (Abb.30). Scheinbehandelte und Mikrofilarien-infizierte Mäuse hatten sechs Stunden nach der PBS-Injektion mittlere Temperaturen zwischen 34,5 und 33,9°C und unterschieden sich nicht von den ko-Mäusen. Somit nahm durch den Sepsisversuch die Temperatur bei immunkompetenten Mäusen um ca. 2°C und bei den TNFR1- und IFNγR-ko-Mäusen um ca. 1°C ab, während sie bei den MARCO-ko-Mäusen 0,5°C höher war.

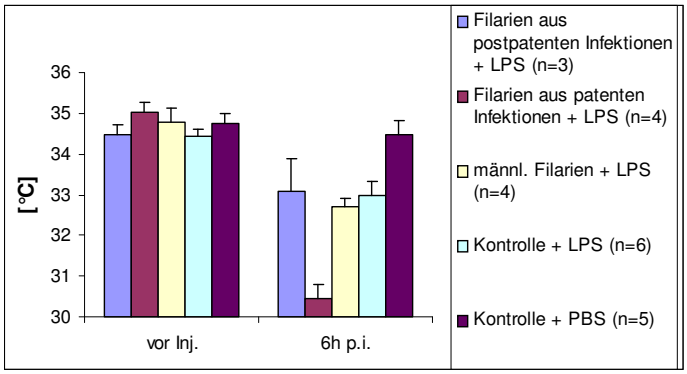


Abb.31: Temperatur vor bzw. 6 h nach der Injektion von LPS oder PBS bei C57BL/6-Mäusen. Den Mäusen wurden zehn Tage zuvor männliche oder aber weibliche Filarien aus patenten oder postpatenten Infektionen implantiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Tiere, die LPS oder PBS injiziert bekamen. Signifikante Veränderungen sind nicht dargestellt. (aM ± SEM)

Die stärkste Temperaturabnahme erfolgte bei Mäusen mit Filarien aus patenten Infektionen, bei denen die Temperatur um 4,5°C auf 30,5±0,3°C abnahm. Bei Mäusen, die männliche oder aber weibliche Filarien aus postpatenten Infektionen implantiert und LPS bekommen hatten, nahm die Temperatur während des Sepsisversuchs um 2°C bzw. 1,5°C auf 32,7±0,2°C bzw. 33,1±0,8°C ab. Dies entsprach den LPS-injizierten unbehandelten Tieren, bei denen die Temperatur um 1,5°C auf 33,0±0,3°C abnahm. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion blieb die Temperatur bei den unbehandelten PBS-injizierten Tieren unverändert bei 34,5±0,3°C.

Direkt vor der LPS-Injektion lagen die Mittelwerte der Temperatur in allen Behandlungsgruppen zwischen 34,5-35°C.

3.2 Immunmodulation durch *E. multilocularis*

3.2.1 Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand

Der Einfluss des *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstandes (EmMed) sowie EmMed mit Vesikeln (EmVes) auf die Zytokinproduktion von humanen PBMC wurde über 96 Stunden verfolgt. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne EmMed kultiviert wurden (Medium).

In diesem Kapitel zeigen die Abbildungen A, B und D dabei jeweils die Konzentrationen der gemessenen Zytokine im Zellkulturüberstand, wobei Abb. A die Zytokin-Konzentrationen von Zellen zeigt, die mit EmMed kultiviert und Abb. B die Zytokin-Konzentrationen von PBMC wiedergibt, die mit EmVes stimuliert wurden. Zwei Stunden nach Inkubationsbeginn wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Abb. C stellt die prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vgl. zu allein LPS stimulierten Zellen (Medium + LPS) dar. Hierfür wurde für jeden einzelnen Blutspender diese prozentuale Veränderung ermittelt und anschließend über alle Blutspender der Mittelwert dieser prozentualen Veränderungen errechnet. In Abb. D wurden die Zytokinkonzentrationen nach 144-stündiger Inkubation dargestellt, wobei die Zellen nach 96 Stunden mit PHA restimuliert worden sind.

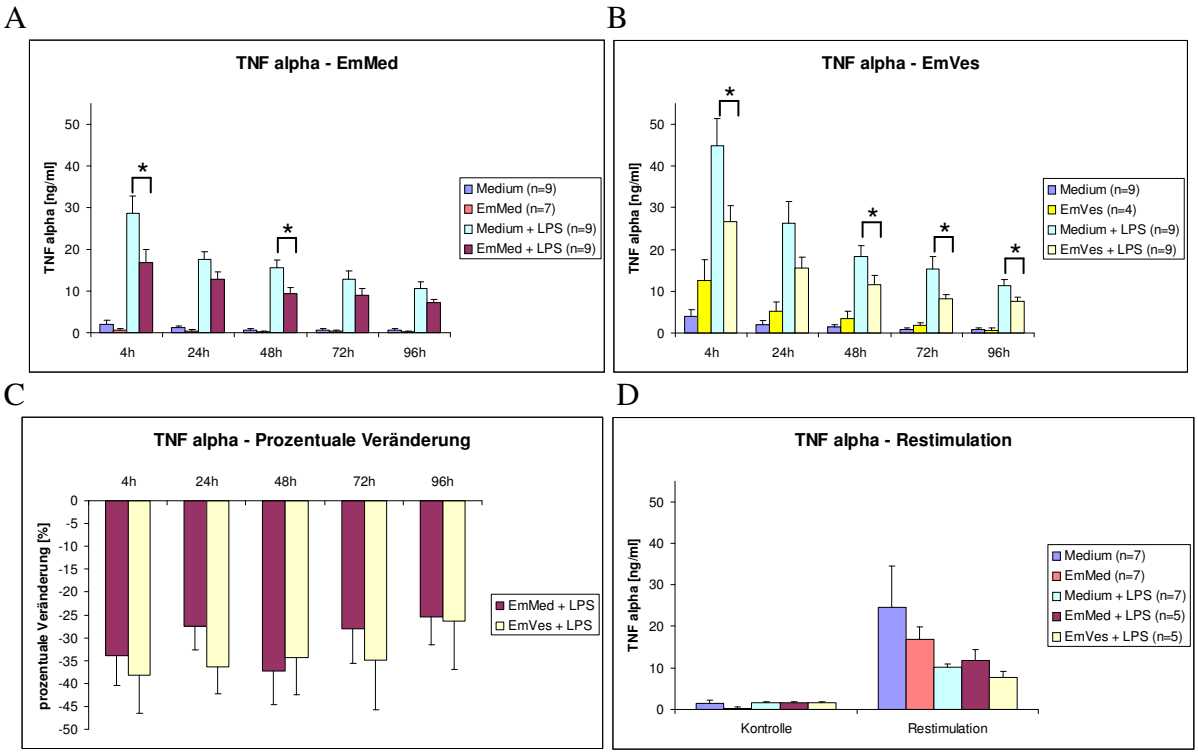


Abb.32: TNFα-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Bild D zeigt die TNFα-Zytokinproduktion der PBMC, die nach 96-stündiger Inkubation mit PHA restimuliert wurden. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

Eine Inkubation mit EmMed und EmVes verringerte zu jedem Zeitpunkt die Zytokinproduktion von LPS-stimulierten PBMC um ca. 30 % im Vergleich zu den Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden (Abb.32 C). Nach 4- und 48-stündiger Inkubation war die TNFα-Konzentration durch eine Co-Kultivierung der LPS-stimulierten PBMC mit EmMed (Abb.32 A) und nach 4, 48, 72 und 96 Stunden bei Co-Kultivierung mit EmVes signifikant verringert (Abb.32 B) im Vergleich zu den LPS-stimulierten PBMC. Im Gegensatz dazu erhöhte eine Stimulation mit EmVes die TNFα-Produktion tendenziell, wenn die PBMC nicht mit LPS stimuliert wurden. PBMC die nur mit EmMed stimuliert wurden, produzierten hingegen tendenziell weniger TNFα als die nicht stimulierten Kontrollen (Medium). Die TNFα-Produktion nach LPS-Stimulation nahm während der Inkubationszeit von 4 bis 96 Stunden kontinuierlich ab. Die Zytokinkonzentrationen lagen nach LPS-Stimulation zu jedem Zeitpunkt signifikant über den Werten ohne LPS-Stimulation.

Abb.32 D zeigt, dass die Zellen nach 96-stündiger Inkubationsdauer noch mit PHA restimuliert werden konnten und alle Ansätze, die mit PHA restimuliert wurden, deutlich höhere TNFα-Konzentrationen hatten als deren Kontrollen ohne Restimulation. Dabei hatten die bereits LPS-stimulierten Zellansätze geringere TNFα-Konzentrationen im Zellkulturüberstand als die Ansätze, die unstimuliert oder aber nur mit EmMed stimuliert waren.

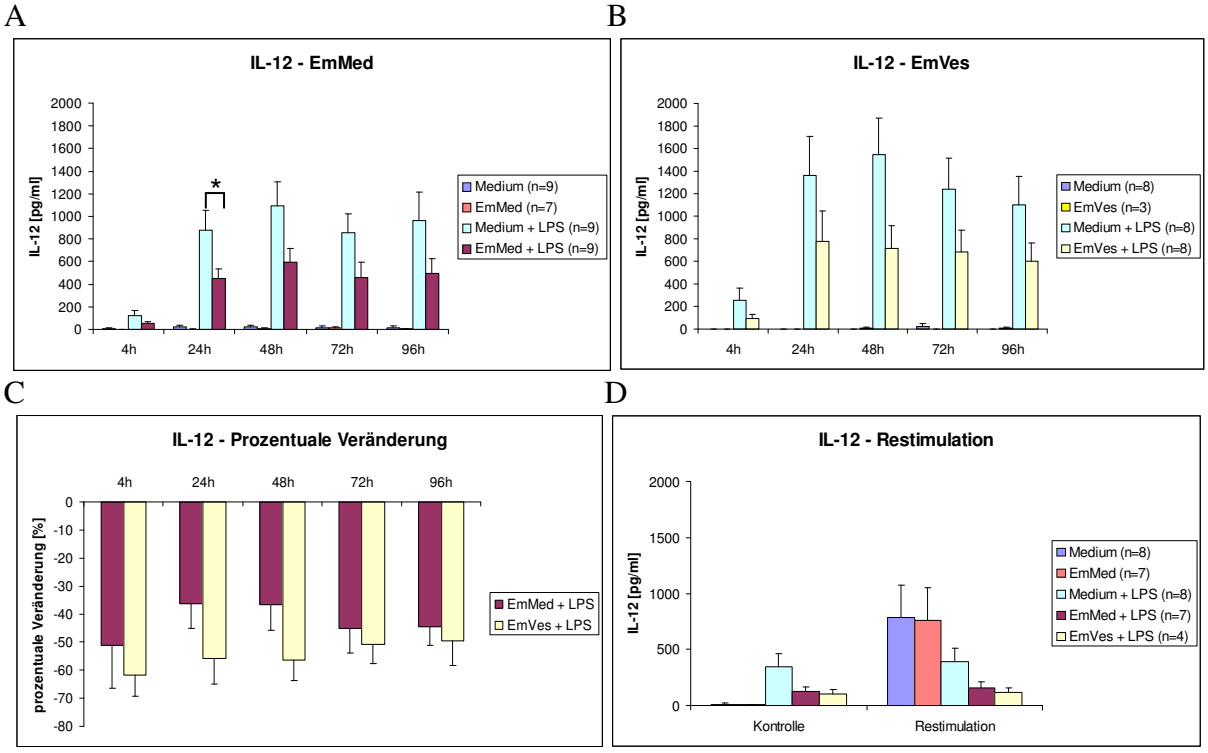


Abb.33: IL-12-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Bild D zeigt die IL-12-Zytokinproduktion der PBMC, die nach 96-stündiger Inkubation mit PHA restimuliert wurden. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*$p<0,05$). (aM ± SEM)

Eine Co-Kultivierung der LPS-stimulierten PBMC mit EmMed sowie EmVes verringerte bei 4- bis 96-stündiger Inkubation der Zellen die IL-12-Konzentration im Vergleich zu den Zellen, die alleine mit LPS stimuliert wurden (Abb.33 A, B). Dieser Vergleich war bei Co-Kultivierung mit EmMed nach 24-stündiger Inkubation, mit EmVes nach 48-stündiger Inkubation signifikant. Dabei wurde IL-12 durch EmMed um ca. 40% und durch EmVes um ca. 50% bei LPS-stimulierten PBMC gegenüber den allein LPS-stimulierten Zellen verringert (Abb.33 C).

Bei den LPS-stimulierten PBMC konnte IL-12 bereits 4 Stunden nach der LPS-Injektion nachgewiesen werden und erreichte nach 48 Stunden die maximale Konzentration. Ohne LPS-Stimulation waren die gemessenen IL-12-Konzentrationen meist unterhalb der Nachweisgrenze, unabhängig davon, ob die PBMC zusätzlich noch mit EmVes oder EmMed stimuliert wurden oder aber völlig unstimuliert waren und unterschieden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant von den LPS-stimulierten Zellen.

Durch die Restimulation mit PHA konnte die IL-12-Konzentration im Zellkulturüberstand bei den Ansätzen, die zuvor nicht mit LPS stimuliert wurden, erhöht werden (Abb.33 D). Die Ansätze, die mit LPS stimuliert wurden, hatten bei einer zusätzlichen späteren PHA-Restimulation kaum mehr IL-12 als die nicht-restimulierten Kontrollen.

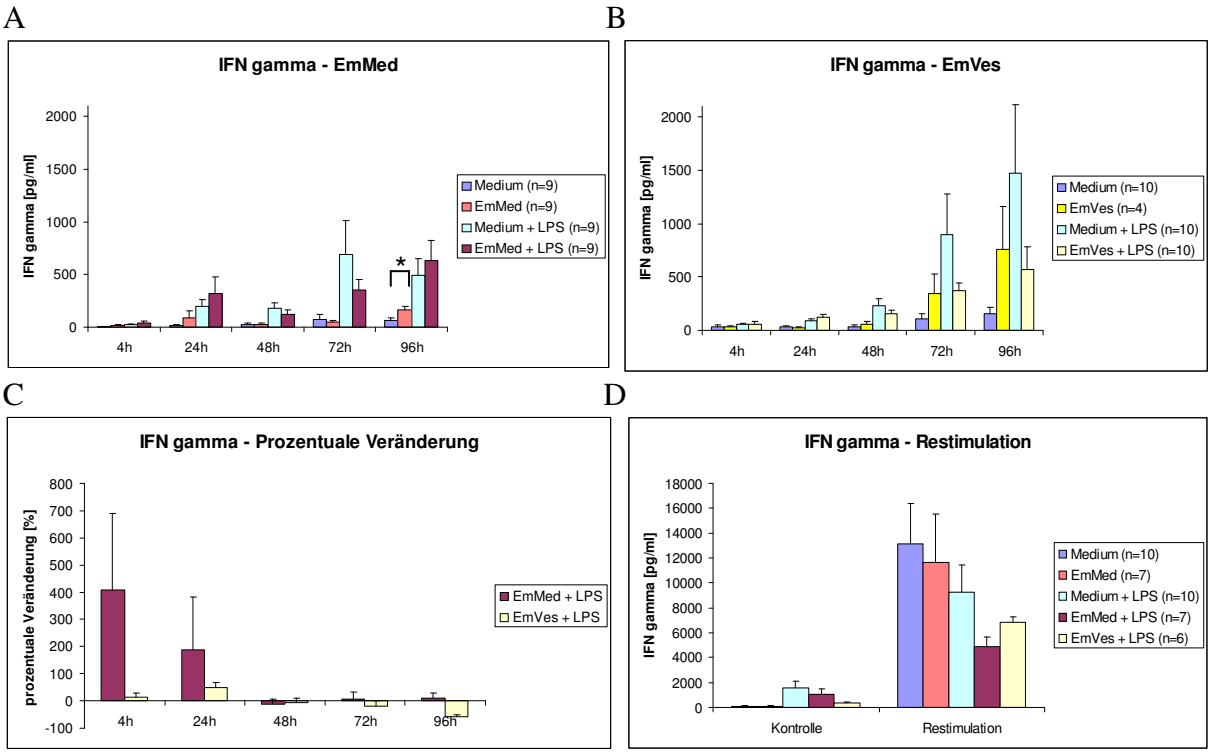


Abb.34: IFNγ-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Bild D zeigt die IFNγ-Zytokinproduktion der PBMC, die nach 96-stündiger Inkubation mit PHA restimuliert wurden. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

Die Co-Stimulierung der LPS-stimulierten PBMC mit EmMed oder EmVes führte zu keinen signifikanten Veränderungen der IFNγ-Konzentration im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten PBMC (Abb.34 C). EmVes erhöhte ohne weitere LPS-Stimulation bei den PBMC im Zellkulturüberstand nach 72- und 96-stündiger Inkubation im Vergleich zu unstimulierten Zellen tendenziell die IFNγ-Konzentration (Abb.34 B), während EmMed nach 96-stündiger Inkubation die IFNγ-Konzentration im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen signifikant erhöhte (Abb.34 A). Erst nach 24-stündiger Inkubation der PBMC erfolgte eine signifikante Zunahme der IFNγ-Konzentration im Zellkulturüberstand verglichen zu den Zellen, die ohne LPS kultiviert wurden, wobei die IFNγ-Konzentration mit der Zeit konstant zunahm.
Die Restimulation mit PHA erhöhte bei allen durchgeführten Ansätzen die IFNγ-Konzentration deutlich im Vergleich zu den nicht restimulierten Kontrollen (Abb.34 D).

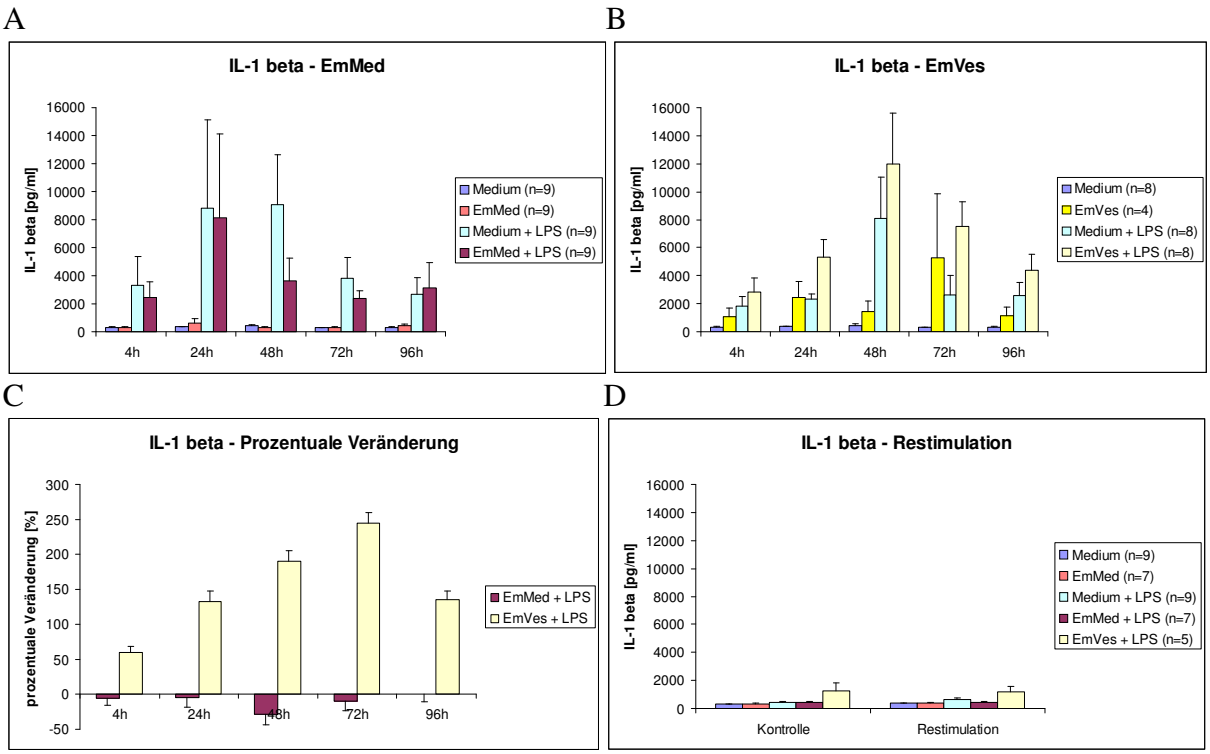


Abb.35: IL-1β-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Bild D zeigt die IL-1β-Zytokinproduktion der PBMC, die nach 96-stündiger Inkubation mit PHA restimuliert wurden. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

Zwischen den alleine mit LPS-stimulierten PBMC und denen mit EmMed co-kultivierten Ansätzen gab es keine signifikanten Unterschiede in der IL-1β-Konzentration (Abb.35 A). Eine Kultivierung mit EmVes führte sowohl bei den LPS-stimulierten (Abb.35 B, C) als auch bei den nicht mit LPS-stimulierten Zellen (Abb.35 B) zu einer tendenziellen Zunahme von IL-1β im Vergleich zu den Medium-Kontrollen. Die Stimulation mit LPS erhöhte zu allen Zeitpunkten signifikant die IL-1β-Konzentration im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, wobei die maximale Zytokinkonzentration zwischen 24 und 48 Stunden gemessen werden konnte.
Die Restimulation mit PHA erhöhte bei keinem der Ansätze die IL-1β-Konzentration im Vergleich zu den nicht-restimulierten Kontrollen (Abb.35 D).

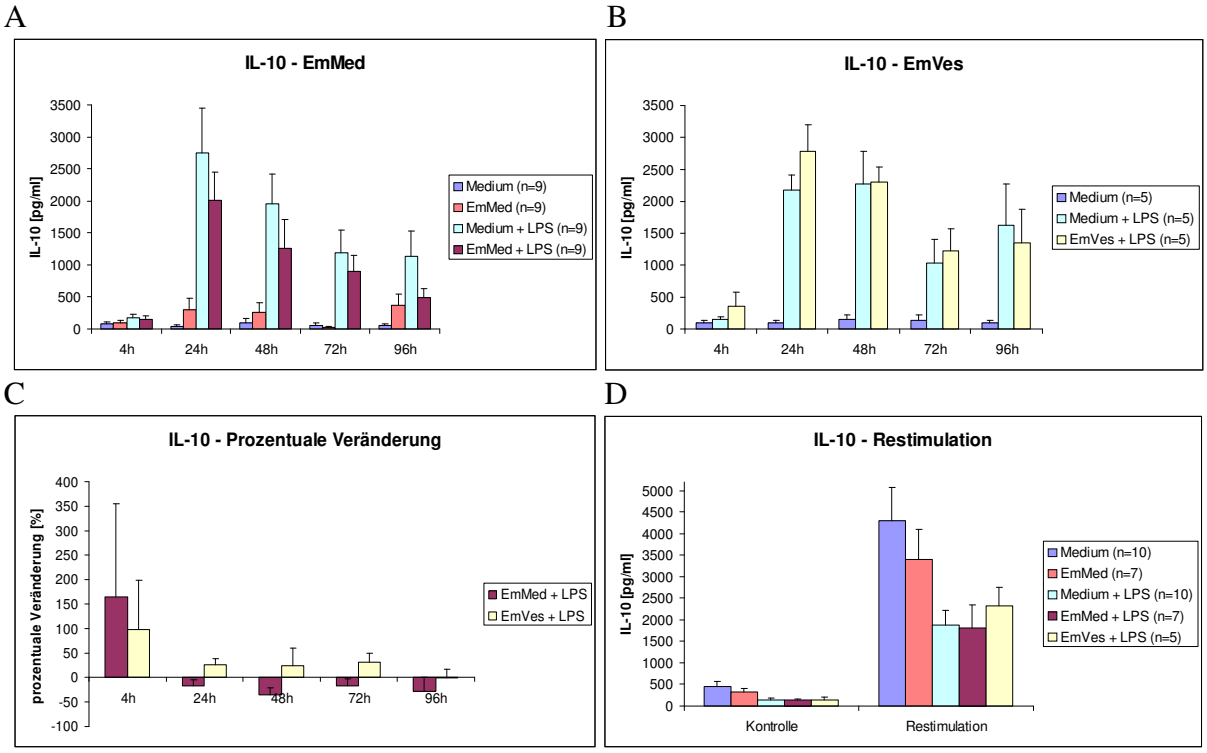
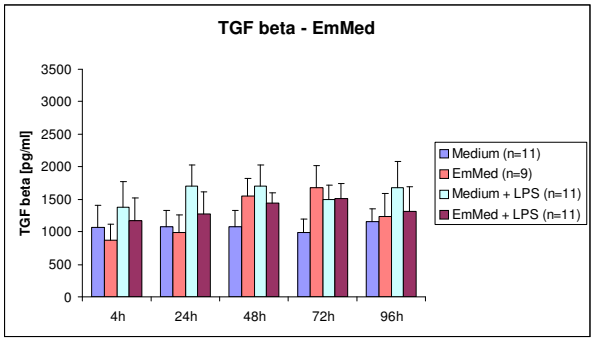


Abb.36: IL-10-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Bild D zeigt die IL-10-Zytokinproduktion der PBMC, die nach 96-stündiger Inkubation mit PHA restimuliert wurden. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

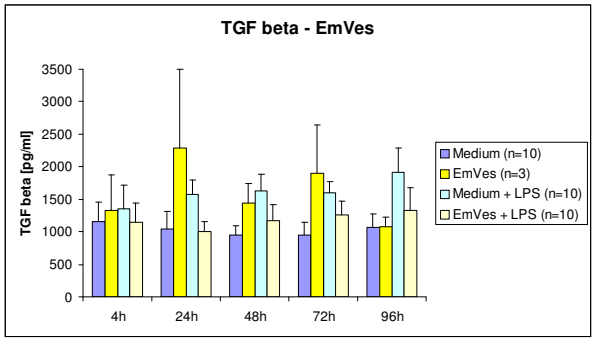
Weder EmMed noch EmVes hatten einen signifikanten Einfluss auf die IL-10-Konzentration, unabhängig davon ob die Zellen mit LPS stimuliert wurden (Abb.36 C) oder nicht (Abb.36 A, B). Ab einer 24-stündigen Inkubation nahm die IL-10-Konzentration bei LPS-stimulierten PBMC im Vergleich zu den unstimulierten PBMC signifikant zu, wobei die höchsten Werte 24 Stunden nach dem Zellkulturansatz gemessen wurden.

Die Restimulation mit PHA führte bei allen Zellkulturansätzen zu einem deutlichen Anstieg der IL-10-Konzentration im Vergleich zu den nicht restimulierten Ansätzen, wobei die Ansätze, die nicht mit LPS angesetzt wurden, deutlich höhere IL-10-Konzentrationen hatten (Abb.36 D).

A



B



C

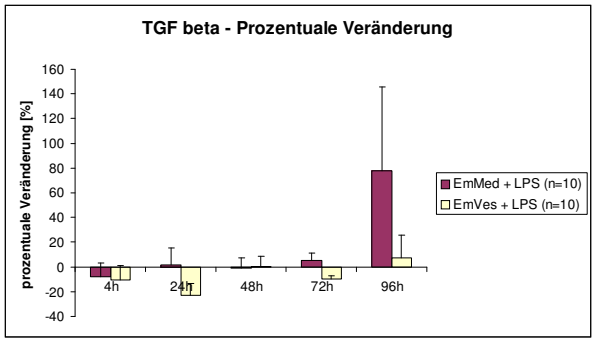


Abb.37: TGFβ-Zytokinproduktion von humanen PBMC, die ohne *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (Medium) bzw. mit Metacestodenkulturüberstand ohne Vesikel (EmMed, Abb. A) und mit Vesikeln (EmVes, Abb. B) kultiviert wurden. Zudem wurden die Zellen mit *E. coli* LPS co-stimuliert. Prozentuale Veränderung der LPS-induzierten Zytokinausschüttung von PBMC im Beisein von EmMed bzw. EmVes, im Vergleich zu allein mit LPS-stimulierten Zellen (Medium + LPS) sind in (C) wiedergegeben. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

Bei den LPS-stimulierten Zellen wirkte sich die Co-Stimulierung der Zellen mit EmVes oder EmMed nicht auf die TGFβ-Konzentration aus (Abb.37 C). Bei den nicht LPS-stimulierten Zellen kam es durch eine Stimulierung der Zellen mit EmVes zwischen 24 und 72 Stunden (Abb.37 B), durch EmMed zwischen 48 und 72 Stunden (Abb.37 A), zu einer nicht signifikanten Zunahme der TGFβ-Konzentration. Die Konzentration von TGFβ war über den gemessenen Zeitraum von 4-96 Stunden konstant zwischen ca. 1000-1500 pg/ml, wobei es durch die Stimulierung der Zellen mit LPS keine signifikante Erhöhung der TGFβ-Konzentration gab.

3.2.2 Genexpression der LPS-stimulierten PBMC

Um den Einfluss einer Co-Kultivierung von LPS-stimulierten PBMC mit EmMed mittels Microarray-Analyse zu testen, wurden von drei Blutspendern PBMC isoliert und für 48 Stunden kultiviert. Als Vergleich dienten PBMC derselben Blutspender, die mit LPS-stimuliert, jedoch ohne EmMed kultiviert wurden.

Dabei wurden 145 Gene differenziell exprimiert, von denen 124 Gene bei den PBMC, die mit EmMed kultiviert wurden, hochreguliert und 21 Gene vermindert exprimiert wurden.

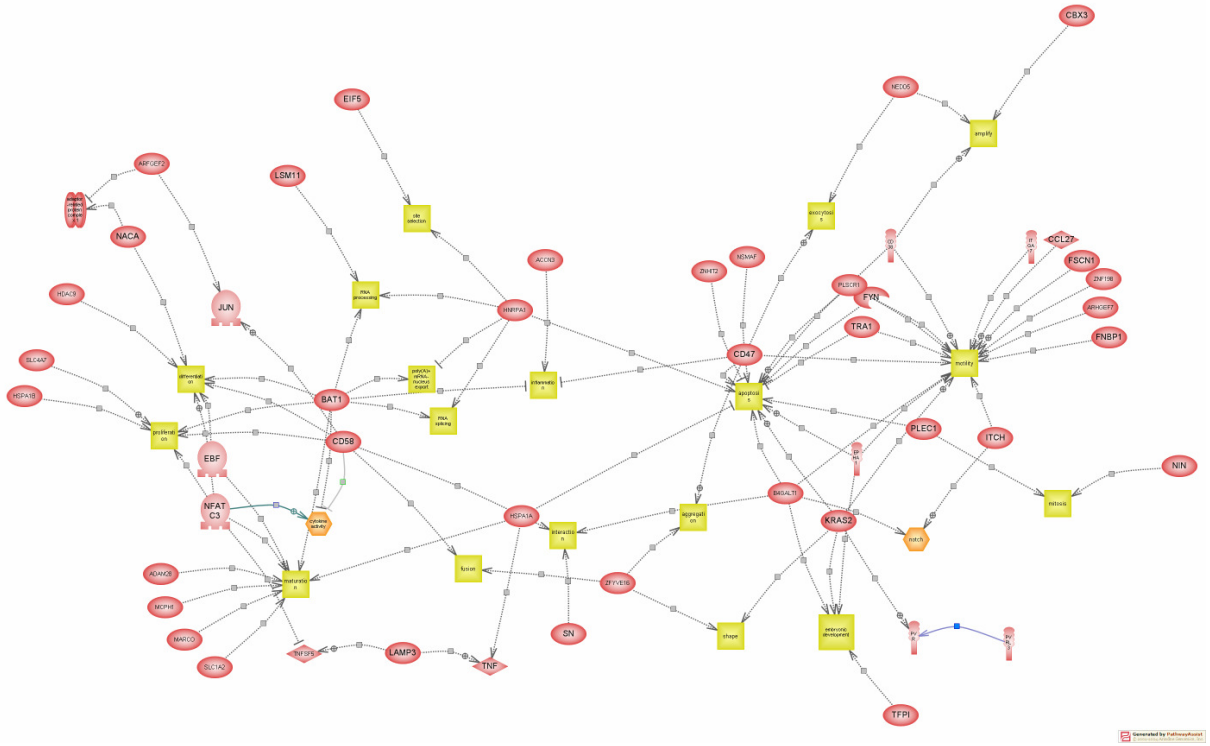


Abb.38: Differenziell exprimierte Gene von humanen PBMC dreier Blutspender, die mit Metacestodenkulturüberstand und LPS kultiviert wurden, im Vergleich zu PBMC, die nur mit LPS stimuliert wurden. Die Abbildung zeigt differenziell exprimierte Gene (rotunterlegt) und deren Funktion (gelbe Quadrate). Hemmende Eigenschaften des jeweiligen Gens auf die dargestellte Funktion sind als „⊣“ dargestellt, Pfeile „→“ weisen auf eine stimulierende Wirkung hin.

Abb.38 zeigt, dass die meisten differenziell exprimierten Gene bei den LPS-stimulierten PBMC, die mit EmMed kultiviert wurden, an der Apoptose (Apoptosis) und Bewegung der Zellen (Motility) beteiligt sind. Die bei der Apoptose beteiligten und hier aufgeführten elf Gene wurden allesamt, bis auf eines (EphA1), hochreguliert. Dabei fördern alle diese Gene die Apoptose, bis auf HSPA1A (**h**eat **s**hock 70 kDa **p**rotein 1A, HSP70) und TRA1 (**T**umor **r**ejection **a**ntigen **1**), die die Apoptose hemmen.
Ebenfalls meist hochreguliert waren Gene, die mit der Bewegung der Zellen assoziiert sind, wobei alle gezeigten Gene die Bewegung der Zellen positiv beeinflussen. Nur EphA1 und ITGA7 (**In**t**eg**rin **a**lpha **7**) wurden im Vergleich zu den LPS-stimulierten Zellen ohne EmMed herunterreguliert.
Die aufgeführten differenziell exprimierten Gene, die mit der Reifung (Maturation), Proliferation und Differenzierung der Zellen assoziiert sind, wurden alle durch die Co-Stimulation der PBMC mit EmMed hochreguliert und fördern diese Eigenschaften der Zellen.
Differenziell exprimierte Gene, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wurden genauer analysiert. Dabei wurden diese Gene nach ihrer Wirkung in anti-inflammatorisch und proinflammatorisch wirkende Gene und zudem nach ihrer Regulation unterteilt.

Anti-inflammatorische Wirkung:

Hochreguliert im Beisein von EmMed:

- BAT1: HLA-B-associated transcripts
    - Negativer Regulator von Entzündungsantworten
    - THP1- und Jurkat-Zellen produzieren mehr TNFα, IL-1 und IL-6 nach Transfektion mit anti-sense-mRNA
    - Kandidatengen für Rheumatoide Arthritis
    - Gen innerhalb der sog. HLAIII-Region, in der Nähe von TNFα und β
- CD47: Integrin-assoziiertes Protein
    - Schlüsselrolle bei der Wirtsabwehr durch Beteiligung an der polymorphnukleären Migration in Antwort auf Bakterieninfektionen und an der polymorphnukleären Aktivierung an extravaskulären Stellen
    - Therapeutisches Target zur Herunterregulierung von inflammatorischen Erkrankungen von Schleimhäuten

Proinflammatorische Wirkung:

Hochreguliert im Beisein von EmMed:

- NFATC3: **n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent **C3**
    - NFATc3-ko-Mäuse mit normaler Zytokinproduktion, aber Mäuse mit NFATc2- und -3-ko haben massive Überproduktion von T_H2-Zytokinen und Erhöhung von IgG1 und IgE → unbalanzierte T_H1/T_H2-Immunantwort mit allergischer Blepharitis und interstitieller Pneumonitis, mit Influx von Eosinophilen und Mastzellen
- HSP70:
    - Verstärkt NFκB-Aktivierung
    - Herunterregulierung von TLR4
    - Induziert TNFα-Poduktion von Monozyten
- MARCO: **ma**crophage **r**eceptor with **co**llagenous structure
    - Typ II Transmembranprotein der Klasse A-Scavenger-Rezeptorfamilie
    - Von Makrophagen verstärkte Expression von MARCO bei bakterieller Infektion, als Ligand dient LPS
    - Wird auch durch Phagozytose toter Zellen von Dendritischen Zellen vermehrt exprimiert
- CD58: **l**ymphocyte **f**unction-**a**ssociated antigen (LFA-1)
    - Interagiert mit CD2 und steigert die Adhäsion des TCR-MHC-Komplexes und damit die T-Zell-Antigen-Interaktion
    - Inhibierung kann immunsuppressiv sein

Herunterreguliert im Beisein von EmMed:

- OASL: 2´5´**O**ligo**a**denylat**s**ynthetase-**l**ike
    - IFN-induziertes Protein, welches die anti-virale Funktion von IFN vermittelt
    - OASL-Expression ist negativ bei Infektion von SLE (**S**ystmischer **L**upus **E**rythematodes)-Patienten korreliert, ansonsten bei SLE erhöht

3.2.3 Identifizierung von anti-inflammatorisch wirkenden Substanzen

Die Eigenschaft des EmMed, die proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-12 im Zellkulturüberstand von LPS-stimulierten PBMC zu hemmen, sollte mittels der folgenden Experimente einer aktiven Komponente zugeschrieben werden.

3.2.3.1 Hitzeinaktiviertes EmMed

Der EmMed wurde für 30 min bei 56°C inkubiert, bevor die Zellen damit stimuliert wurden.

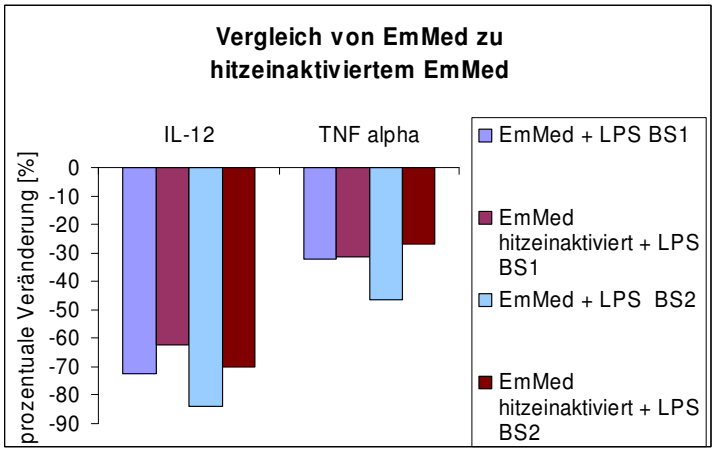


Abb.39: Hemmung der TNFα- und IL-12-Zytokinausschüttung von LPS-stimulierten PBMC, die mit *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstand (EmMed) oder hitzeinaktiviertem EmMed 48 h inkubiert wurden. Dargestellt ist die prozentuale Veränderung der Zytokinausschüttung von LPS-stimulierten PBMC im Vergleich zu ebenfalls LPS-stimulierten PBMC, die mit EmMed Co-kultiviert wurden. Die Ergebnisse stammen von zwei Blutspendern (BS1 und BS2).

Sowohl TNFα als auch IL-12 wurden von LPS-stimulierten PBMC, die mit herkömmlichem EmMed, aber auch mit hitzeinaktiviertem EmMed kultiviert wurden, im Vergleich zu allein LPS-stimulierten PBMC, vermindert produziert (Abb.39). Dabei wurde die IL-12-Konzentration vom herkömmlichen EmMed bei beiden Blutspendern um 72 bzw. 84% gehemmt, während der hitzeinaktivierte EmMed die IL-12-Konzentration um 62 und 70% hemmte. TNFα wurde durch eine Co-Kultivierung mit herkömmlichem EmMed um 32 und 46% gehemmt, mit hitzeinaktiviertem EmMed um 31 und 27%.

3.2.3.2 Metacestoden in serumfreien oder Serumersatzmedien

Die Identifizierung einer aktiven Komponente im EmMed wurde dadurch erschwert, dass für die Kultur des Metacestoden FBS-haltiges Medium verwendet wurde. Der damit einhergehende hohe Proteinanteil im Medium ließ es nicht zu, Proteine zu identifizieren, die vom Metacestoden stammten und im Vergleich zum Kontrollmedium ohne EmMed angereichert waren.

Deshalb wurde der Metacestode in insgesamt drei verschiedenen serumfreien bzw. Serumersatzmedien gehalten, um Proteine, die im EmMed im Vergleich zur Kontrolle angereichert waren, zu identifizieren.

Allerdings ging die Vesikel-Proliferation des Metacestoden innerhalb von zwei Wochen in allen drei verwendeten FBS-freien Medien stark zurück, so dass davon ausgegangen werden musste, dass für die erfolgreiche Kultivierung des Metacestoden FBS nötig war. Daher wurde für die weitere Identifizierung der aktiven Komponente wieder auf EmMed zurückgegriffen, der von FBS-haltigen Kulturen stammte.

3.2.3.3 EmMed-Fraktionen der PD-10-Säule

Die Auftrennung des EmMed über die PD-10-Säule wurde durchgeführt, um einen ersten Anhaltspunkt für die mögliche Größe der aktiven Komponente zu haben und sie dadurch etwas einzuschränken. Bei der Fraktionierung des EmMed über die PD-10-Säule wurden die 15 folgenden Elutionen nach dem Einspritzen des EmMed aufgefangen und damit die PBMC zusätzlich zum LPS stimuliert. Die veränderte Zytokinausschüttung im Vergleich zu Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden, wurde in Abb.40 dargestellt.

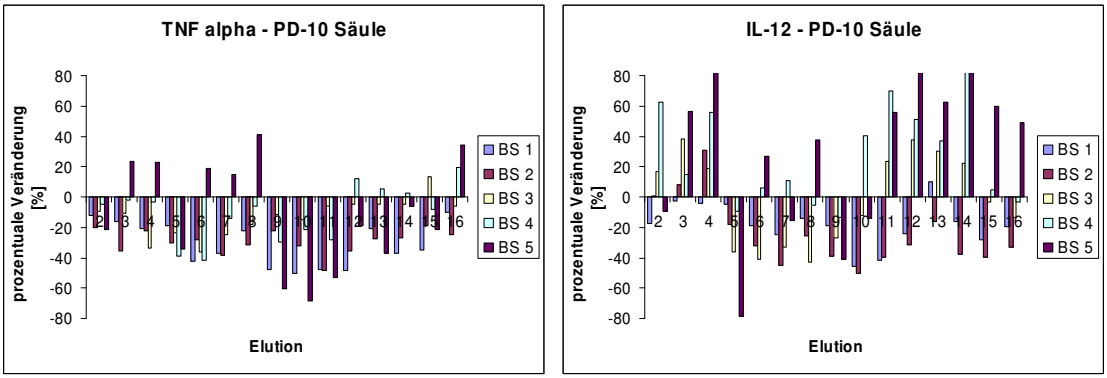


Abb.40: TNFα- und IL-12-Zytokinausschüttung von LPS-stimulierten PBMC, die mit den gesammelten Metacestodenkulturüberstand-Elutionen 2-16 der PD-10-Säule für 48 h kultiviert wurden, im Vergleich zu LPS-stimulierten PBMC, denen nur PBS zugegeben wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf Blutspendern (BS).

Beinahe ausnahmslos alle Blutspender und alle Elutionen verminderten die TNFα-Konzentration im Zellkulturüberstand der LPS-stimulierten Zellen, verglichen mit Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden. Dabei war die Hemmung der TNFα-Konzentration bei den Elutionen 9-11 am gleichmäßigsten bei den getesteten Blutspendern und auch am stärksten ausgeprägt (Mittelwerte zwischen 34-38%).

Im Vergleich zu der veränderten TNFα-Konzentration gab es bei der IL-12-Konzentration ein deutlich uneinheitlicheres Ergebnis. Die Elutionen 2-4, die vorwiegend die Salze enthielten, und die Fraktionen 11-16 unterschieden sich deutlich in der prozentualen Veränderung der IL-12 Ausschüttungen bei den getesteten fünf Blutspendern. Die Elutionen 5-10 verminderten eher die IL-12-Konzentration der LPS-stimulierten PBMC im Vergleich zu den LPS-stimulierten Kontrollen, wobei das Ergebnis nur für die Elution Nr. 9 bei allen Blutspendern einheitlich war und eine Verminderung der IL-12-Konzentration um 28% zeigte.

3.2.3.4 EmMed-Fraktionen der HPLC

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass die Fähigkeit des EmMed die LPS-induzierte TNFα- und IL-12-Produktion zu hemmen, durch Tieffrieren nicht verloren ging (ohne Abb.). Zudem konnte der EmMed lyophilisiert werden, wodurch ebenfalls diese Eigenschaft erhalten blieb (ohne Abb.).

Dies ermöglichte eine Trennung des EmMed mittels HPLC. In Vorversuchen wurde die optimale Trennung des EmMed getestet, wobei sich eine vorherige Trennung über eine SepPak C18-Cartridge, wodurch die Salze größtenteils entfernt wurden, als positiv erwies.

Die nachfolgenden Darstellungen zeigen die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten HPLC-Läufen, mit jeweils einer neuen Charge von EmMed (Abb.41).

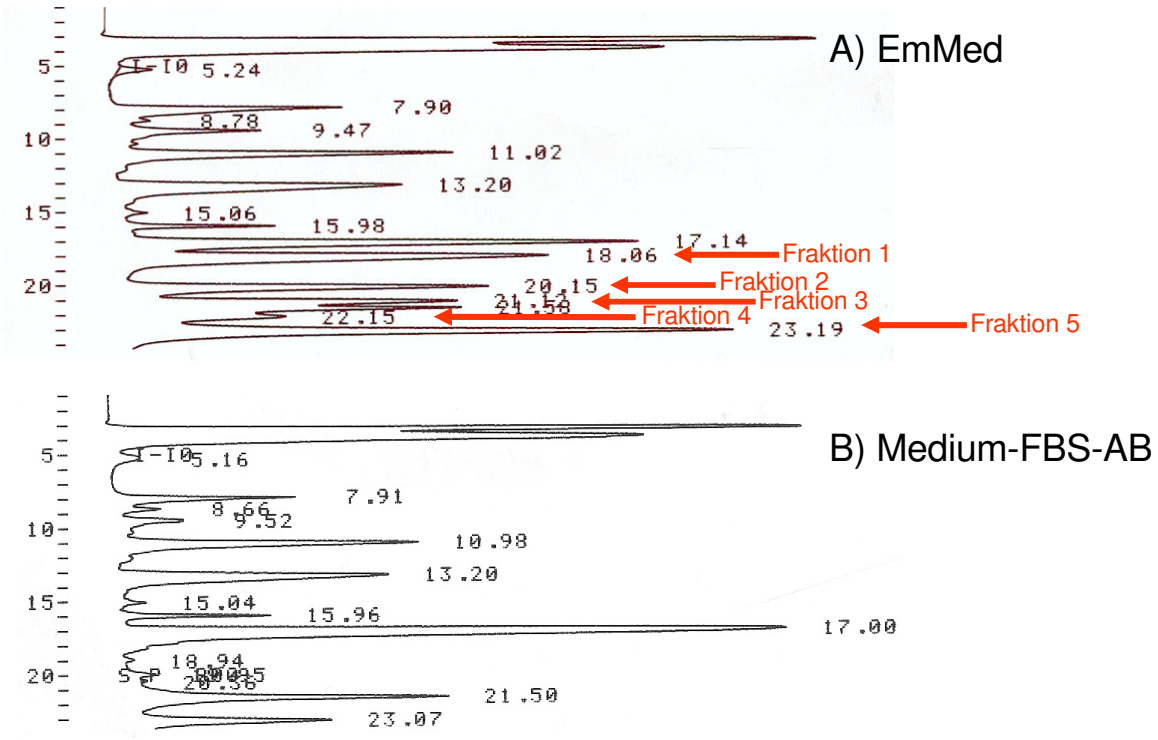


Abb.41: HPLC-Lauf des *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstandes (EmMed) (A) sowie der Medium-FBS-AB-Kontrolle (B). Unterschiede zwischen diesen beiden sind durch Pfeile markiert.

In früheren Versuchen wurden von allen aufgetretenen Peaks in der HPLC die jeweiligen Fraktionen gesammelt und auf die Eigenschaft, die LPS-induzierte TNFα- und IL-12-Produktion von PBMC zu hemmen, untersucht. Dabei wurden die gesammelten Fraktionen lyophilisiert und anschließend für die Stimulation der PBMC in PBS aufgenommen. Als Kontrolle wurde PBMC dasselbe Volumen an PBS zugegeben. In Abb.41 wurden nur unterschiedlich vorkommende Peaks zwischen den HPLC-Läufen von EmMed und der Medium-FBS-AB Kontrolle hervorgehoben. Es konnten dabei fünf Peaks ermittelt werden, die zwischen ca. 18,6 und 23,5 Minuten im HPLC-Lauf auftraten und nur im EmMed vorhanden waren. Die dazugehörigen Fraktionen wurden gesondert gesammelt, tiefgefroren und lyophilisiert. Die Eigenschaft dieser fünf Fraktionen, die TNFα- und IL-12-Produktion der LPS-stimulierten PBMC zu hemmen, wurde in Abb.42 dargestellt.

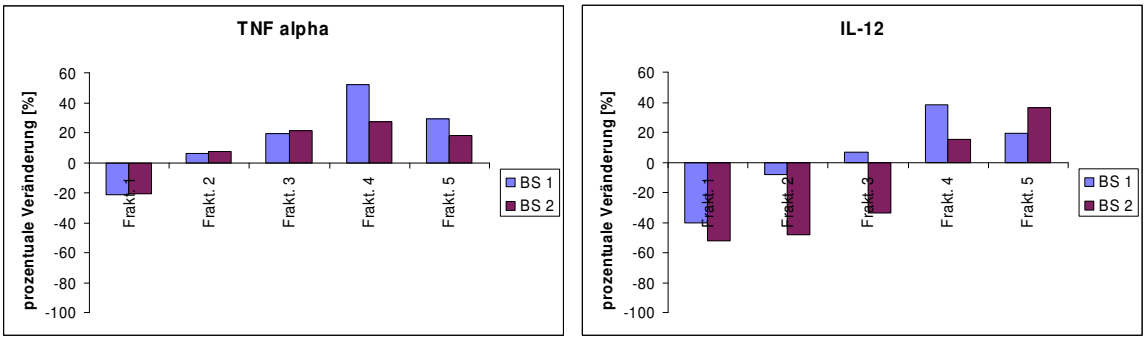


Abb.42: TNFα- und IL-12-Zytokinausschüttung von LPS-stimulierten PBMC, die mit einer der fünf HPLC-Fraktionen des Metacestodenkulturüberstandes (Frakt. 1-5) für 48 h kultiviert wurden, im Vergleich zu LPS-stimulierten PBMC, denen nur PBS zugegeben wurde. Gezeigt werden die Ergebnisse zweier Blutspender (BS).

Fraktion 1, die im HPLC-Lauf von EmMed nach ca. 18,6 Minuten auftrat, reduzierte bei beiden getesteten Blutspendern sowohl die TNFα- als auch die IL-12-Konzentration im Vergleich zu den Zellen, die mit dem entsprechenden Volumen PBS kultiviert wurden (Abb.42). Dabei reduzierte die Fraktion 1 die TNFα-Konzentration um ca. 20%, die IL-12-Konzentration um ca. 40%. Die restlichen vier Fraktionen erhöhten die TNFα-Konzentration im Vergleich zur PBS-Kontrolle. Die Fraktionen 2 und 3 verhielten sich bei IL-12 ungleichmäßig bei den beiden getesteten Blutspendern, und die Fraktionen 4 und 5 erhöhten die IL-12-Konzentration.

In zwei weiteren HPLC-Läufen und anschließendem Test auf die Hemmung der TNFα- und IL-12-Konzentration wurde dieses Ergebnis für die Fraktion 1 bestätigt. Dabei wurde zudem die entsprechende Fraktion in der Medium-FBS-AB-Kontrolle gesammelt und ebenfalls auf diese Eigenschaft hin untersucht (Abb.43).

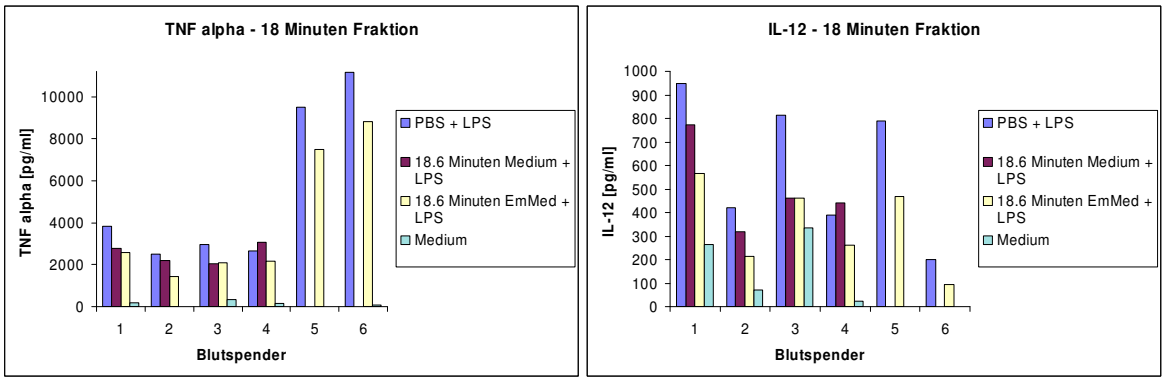


Abb.43: TNFα- (links) und IL-12-Konzentration (rechts.) von PBMC in pg/ml, die mit PBS und LPS (PBS+LPS), der 18,6-Minuten-Fraktion des *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstandes und LPS (18,6 Minuten EmMed + LPS) oder der entsprechenden Fraktion der Medium-Kontrolle und LPS (18,6 Minuten Medium + LPS) für 48 h kultiviert wurden. Zudem ist die Zytokinproduktion von unstimulierten Zellen angegeben (Medium). Bei den Blutspendern 5 und 6 wurde keine 18,6-Minuten-Fraktion der Medium-Kontrolle getestet.

Wie die Abb.43 zeigt, lagen die TNFα- und IL-12-Konzentrationen der PBMC, die mit der 18,6-Minuten-Fraktion des EmMed kultiviert und mit LPS-stimuliert wurden, bei allen getesteten Blutspendern unterhalb der Konzentrationen an TNFα und IL-12, die von PBMCs produziert wurden, die mit der entsprechenden Menge an PBS kultiviert und ebenfalls mit LPS-stimuliert wurden. Die entsprechende 18,6-Minuten-Fraktion der Medium-FBS-AB-Kontrolle konnte bei drei von vier Blutspendern die TNFα- und IL-12-Konzentration der PBMC im Vergleich zu den mit PBS kultivierten PBMC verringern. Bei ebenfalls drei von vier Blutspendern war die TNFα- und IL-12-Konzentration bei PBMC, die mit der 18,6-Minuten-Fraktion des EmMed kultiviert wurden, geringer als bei denen, die mit der 18,6-Minuten-Fraktion der Medium-FBS-AB-Kontrolle stimuliert wurden.

3.2.3.5 Identifizierung der aktiven Komponente

Um die aktive Komponente dieser 18,6-Minuten-Fraktion des EmMed zu identifizieren, wurde zum einen die Fraktion über eine LC/ESI-MS analysiert, zum anderen über den Edman-Abbau sequenziert.

Die bei der LC/ESI-MS-Analyse integrierte HPLC zeigte, dass in der 18,6-Minuten-Fraktion des EmMed zwei Peaks (P1 und P2) zu diesem Zeitpunkt auftreten (Abb.44). Peak 1 (P1) wurde nach 18,8 Minuten detektiert und hatte eine höhere Intensität als der zweite Peak (P2), der nach 19,3 Minuten auftrat.

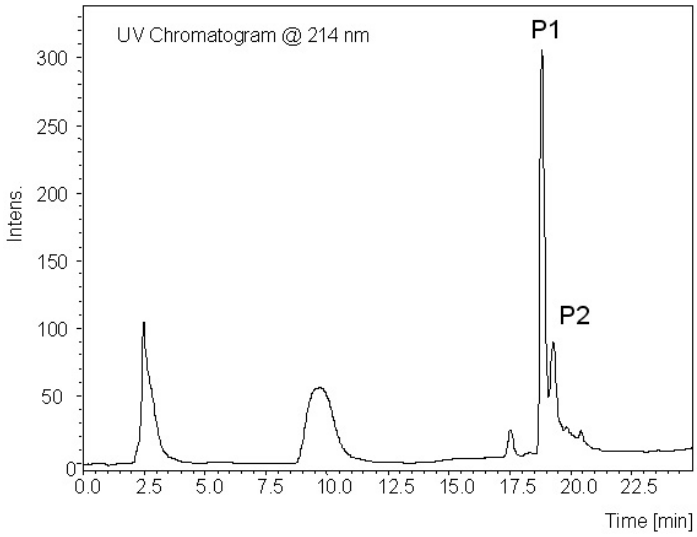


Abb.44: HPLC-Lauf der gesammelten 18,6-Minuten-Fraktion des *E. multilocularis*-Metacestodenkulturüberstandes mit zwei Peaks (P1 und P2).

Das aufsummierte Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum, das während der Elution des ersten Peaks (P1) aufgenommen wurde, zeigte eine Komponente mit einem monoisotopischen Molekulargewicht von 1019,38 Da (Abb.45).

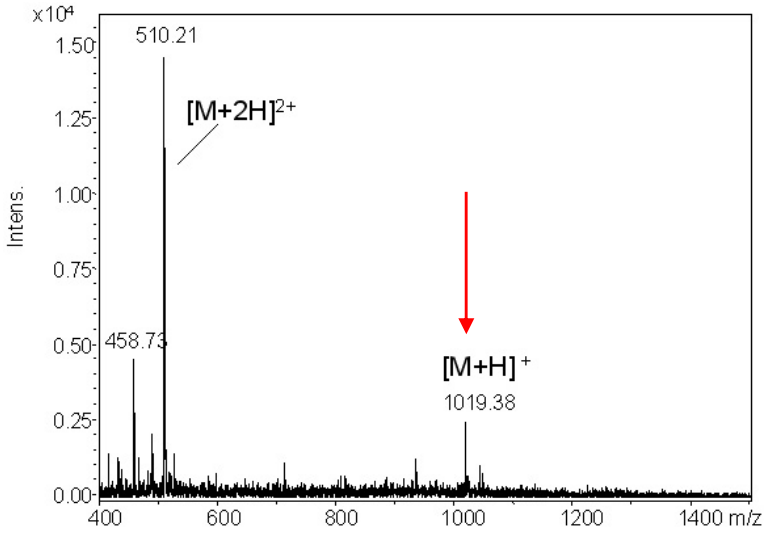


Abb.45: Aufsummiertes Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum, aufgenommen während der Elution von Peak 1. Der Pfeil zeigt eine Komponente mit 1019,38 Da.

Die Aufnahme des aufsummierten Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrums, während der Elution des zweiten Peaks (P2) ergab eine Komponente mit 1914,87 Da (Abb.46).

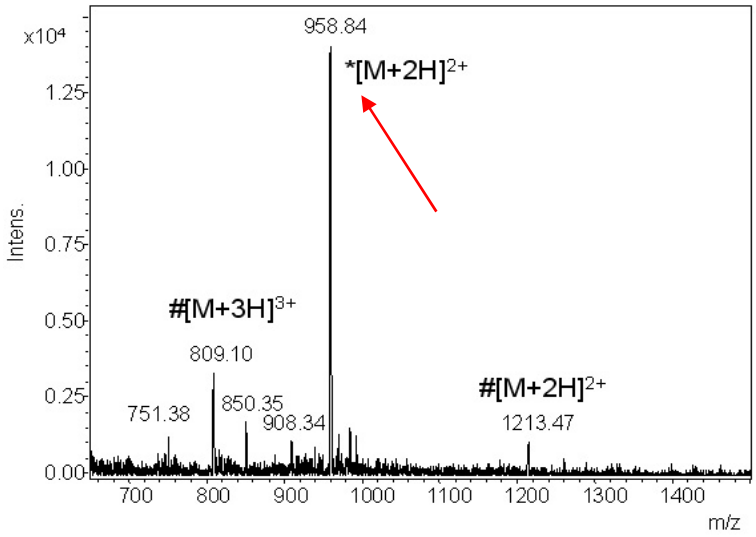


Abb.46: Aufsummiertes Positiv-Ionen-ESI-Massenspektrum, aufgenommen während der Elution von Peak 2. Der Pfeil zeigt eine Komponente mit 1914,87 Da.

Eine Fragmentionen-Analyse der Komponente im Peak 2 sowie der Edman-Abbau erbrachten die Aminosäure-Sequenz dieses Peaks.

Aminosäuresequenz von Peak 2:
TDYDEGQDDRPKVGLGA.R

Die Datenbank-Recherche ergab für diese Sequenz das Fibrinopeptid B, das ein Bestandteil der β-Kette des Fibrinogen und bovinen Ursprungs ist, und somit aus dem FBS des Zellmediums stammt. Allerdings wies das identifizierte Fibrinopeptid B eine Modifikation am Tyrosinrest 6 auf, der sulfatisiert war.

3.2.3.6 Dosis-Wirkungs-Kurve von Fibrinopeptid B

Synthetisch hergestelltes Fibrinopeptid B, das allerdings nicht die Sulfotyrosin-Modifikation aufwies, wurde in einer Dosis-Wirkungs-Kurve auf die Eigenschaft, LPS-induziertes TNFα oder IL-12 in der PBMC-Kultur im Vergleich zu PBS-behandelten-Kontrollen zu hemmen, untersucht.

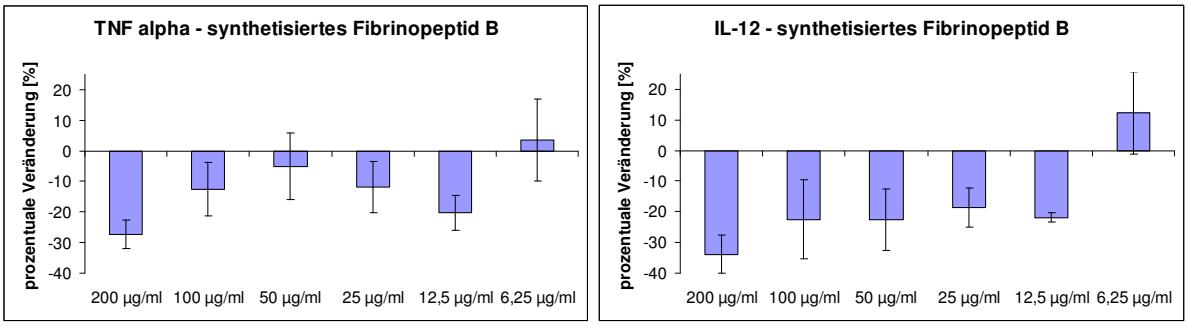


Abb.47: Prozentuale Veränderung der TNFα- und IL-12-Zytokinausschüttung von LPS-stimulierten PBMC, die mit Konzentrationen von 200 µg/ml bis 6,25 µg/ml des synthetisierten Fibrinopeptid B für 48 h kultiviert wurden, im Vergleich zu LPS-stimulierten PBMC, denen nur PBS zugegeben wurde.(aM ± SEM; n=4)

Die Zugabe von synthetisiertem Fibrinopeptid B zu LPS-stimulierten PBMC führte zu einer Dosis-abhängigen Veränderung der TNFα- und IL-12-Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu PBMC mit PBS und LPS (Abb.47). Dabei nahm die prozentuale Hemmung der LPS-induzierten TNFα-Konzentration von PBMC, die mit einer Konzentration von 200 bis 50 µg/ml von Fibrinopeptid B stimuliert wurden, von 27 auf 5% ab, stieg anschließend bei Konzentrationen von 25 und 12,5 µg/ml wieder auf 12 und 20% an und hatte bei 6,25 µg/ml keinen Einfluss auf die TNFα-Konzentration.

Die prozentuale Hemmung von LPS-induziertem IL-12 durch das synthetisierte Fibrinopeptid B war bei einer hohen Dosis von 200 µg/ml am stärksten (34%) und nahm mit geringer werdender Dosis des Fibrinopeptids B bis zu 25 µg/ml kontinuierlich ab (19%). Während 12,5 µg/ml Fibrinopeptid B IL-12 noch um 22% hemmte, erhöhten 6,25 µg/ml die IL-12-Konzentration im Vergleich zu den PBMC, die mit PBS und LPS kultiviert wurden.

3.2.4 Sepsisversuch mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/1-Mäusen

Der Einfluss einer bestehenden *E. multilocularis*-Infektion auf eine LPS-induzierte Sepsis *in vivo* wurde mit 12 Wochen lang infizierten DBA/1-Mäusen untersucht. Die verwendeten DBA/1-Mäuse waren beiderlei Geschlechts und wurden gleichmäßig über die unterschiedlich behandelten Gruppen verteilt. Die Mäuse waren i. p. mit 20000 Protoscolices infiziert. Zehn Wochen nach der Infektion wurde zur Zytokinbestimmung Blut abgenommen und zwölf Wochen nach der Infektion durch i. p. Injektion von *E. coli* LPS (4 µg/g Körpergewicht) die Sepsis ausgelöst. Eine und sechs Stunden nach der LPS-Injektion wurde Blut für die Zytokinbestimmung abgenommen. Am nächsten Tag wurden die DBA/1-Mäuse eingeschläfert und obduziert, um die Infektion mit *E. multilocularis* zu bestätigen.

Die Zusammensetzung der Versuchsgruppen für DBA/1- und DBA/2-Mäuse (Kap. 3.2.5) zeigt Tab.7.

Behandlung	**DBA/1**	**DBA/2**
E. multilocularis + LPS	n = 7	n = 7
E. multilocularis + PBS	n = 5	n = 6
Scheininfektion + LPS	n = 6	n = 6
Scheininfektion + PBS	n = 7	n = 5

Tab.7: Anzahl der im Versuch verwendeten DBA/1 und DBA/2 Mäuse, sowie deren Behandlung.

3.2.4.1 Zytokinproduktion

Die Ergebnisse der Zytokinmessungen sind in Abb.48 gezeigt.

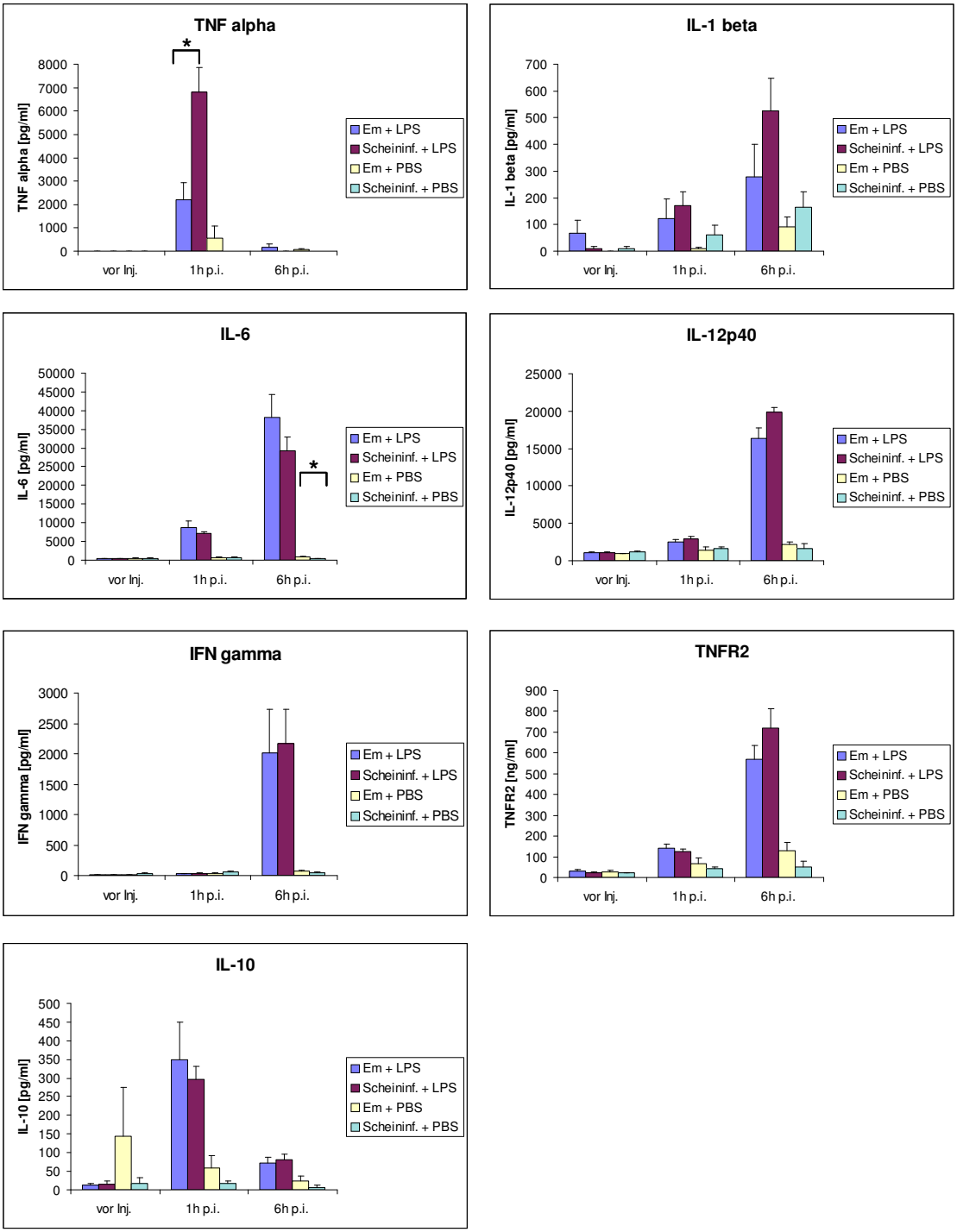


Abb.48: Zytokinproduktion von *E. multilocularis*-(Em) und scheininfizierten (Scheininf.) DBA/1-Mäusen vor der PBS- bzw. LPS-Injektion (vor Inj.) sowie 1 und 6 h nach der LPS-Gabe (1h p.i., 6h p.i.). Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

E. multilocularis-infizierte Mäuse hatten eine Stunde nach der LPS-Gabe eine signifikant geringere TNFα-Konzentration (2202±718 pg/ml) als scheininfizierte Mäuse (6825±1032 pg/ml). Dabei produzierten scheininfizierte Mäuse mit LPS-Injektion signifikant mehr TNFα als die PBS-Kontrollen (scheininfiziert 40±36 pg/ml bzw. *E. multilocularis*-infizierte 520±521 pg/ml). Eine Stunde nach der LPS-Injektion wurden die höchsten TNFα-Konzentrationen im Plasma gemessen. Bereits sechs Stunden nach der LPS-Injektion lag bei den meisten Tieren, unabhängig von der Behandlung, die TNFα-Konzentration bereits wieder unterhalb der Nachweisgrenze. Auch vor der LPS-Injektion lag die TNFα-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA (Abb.48).

Zu keinem Zeitpunkt kam es zu signifikanten Unterschieden in der IL-1β-Konzentration zwischen *E. multilocularis*-infizierten und scheininfizierten Tieren bei LPS-Behandlung oder aber PBS-Injektion. Die Konzentration von IL-1β im Plasma stieg nach der LPS-Injektion mit der Zeit an. Vor der Injektion konnte bei den meisten Mäusen kein IL-1β nachgewiesen werden. Bereits eine Stunde nach der LPS-Injektion produzierten Tiere mit LPS-Injektion tendenziell mehr IL-1β als die PBS-Kontrollen; nach sechs Stunden war dieser Effekt zwischen PBS und LPS behandelten scheininfizierten Tieren signifikant (167±149 pg/ml gegenüber 526±299 pg/ml).

Zwischen *E. multilocularis*-infizierten und scheininfizierten Tieren gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede nach LPS-Behandlung. Hingegen ließ sich bei *E. multilocularis*-infizierten Tieren sechs Stunden nach PBS-Injektion eine höhere IL-6-Konzentration nachweisen als bei scheininfizierten PBS-Kontrollen (863±127 pg/ml gegenüber 442±70 pg/ml). Vor der Injektion von LPS ließ sich IL-6 bei *E. multilocularis*- und scheininfizierten Mäusen im Plasma nachweisen (420±63 pg/ml gegenüber 461±50 pg/ml). Tiere mit LPS-Injektion produzierten eine und sechs Stunden nach Injektion signifikant mehr IL-6 als die PBS-Kontrollen. Dabei stiegen die IL-6-Konzentrationen nach LPS-Injektion mit der Zeit an.

E. multilocularis-infizierte Tiere unterschieden sich nicht von scheininfizierten Tieren innerhalb der PBS-behandelten oder aber LPS-injizierten Tiere in der Menge von IL-12p40 im Plasma. Die IL-12p40-Konzentration im Plasma der Mäuse betrug vor der LPS-Injektion etwa 1000 pg/ml. Eine Stunde nach der Injektion lag bei scheininfizierten Mäusen mit LPS-Injektion die IL-12p40-Konzentration (2967±313 pg/ml) signifikant über den Werten von

scheininfizierten Mäusen mit PBS-Injektion (1611±201 pg/ml). LPS-injizierte Tiere hatten sechs Stunden nach der Injektion die höchsten gemessenen IL-12p40-Werte, die sowohl bei *E. multilocularis*-infizierten (16400±1332 pg/ml) als auch bei scheininfizierten Tieren (19815±683 pg/ml) signifikant über denen der entsprechenden PBS-Kontrolltiere lagen (2156±320 pg/ml, 1686±553 pg/ml).

Die IFNγ-Konzentration unterschied sich weder bei LPS-Behandlung noch bei PBS-Injektion signifikant zwischen *E. multilocularis*- und scheininfizierten Tieren. IFNγ ließ sich vor der Injektion und eine Stunde nach LPS-Injektion bei allen Mäusen in geringen Konzentrationen (<100 pg/ml) nachweisen, die sich jedoch nicht nach Behandlung unterschieden. Sechs Stunden nach der Injektion hatten LPS-behandelte Tiere signifikant mehr IFNγ (*E. multilocularis*-infizierte 2020±1870 pg/ml, Scheininfizierte 2165±1374 pg/ml) im Plasma als die PBS-Kontrollen (*E. multilocularis*-infizierte 77±13 pg/ml, Scheininfizierte 42±21 pg/ml).

E. multilocularis-infizierte Tiere unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt in der TNFR2-Konzentration von scheininfizierten Tieren, die dieselbe Injektion erhielten. Der TNFR2 ließ sich im Plasma aller Mäuse vor der Injektion von LPS im Plasma nachweisen (22-31 ng/ml). Die Injektion von LPS erhöhte die TNFR2-Konzentration bereits nach einer Stunde, wobei scheininfizierte Mäuse mit LPS-Injektion (127±9 ng/ml) signifikant mehr TNFR2 im Plasma hatten als scheininfizierte Tiere nach PBS-Injektion (44±8 ng/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion stieg die TNFR2-Konzentration weiter an, so dass sowohl *E. multilocularis*-infizierte (569±69 ng/ml) als auch scheininfizierte Tiere (718±96 ng/ml) signifikant höhere Konzentrationen als die entsprechenden PBS-Kontrollen (132±39 ng/ml, 52±25 ng/ml) hatten.

Eine Infektion mit *E. multilocularis* erhöhte zu keinem Zeitpunkt die Konzentration von IL-10 im Plasma der Mäuse verglichen mit scheininfizierten Tieren. Dagegen führte die Injektion von LPS bereits eine Stunde nach Injektion zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10-Konzentration (*E. multilocularis*-infizierte 350±99 pg/ml, Scheininfizierte 296±35 pg/ml) verglichen mit Tieren, die PBS erhielten (*E. multilocularis*-infizierte 60±32 pg/ml, Scheininfizierte 18±6 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion verringerte sich die IL-10-Konzentration wieder (*E. multilocularis*-infizierte 72±15 pg/ml, Scheininfizierte 82±14 pg/ml), blieb aber dennoch signifikant über den Werten der PBS-Kontrolltiere (*E. multilocularis*-infizierte 23±15 pg/ml, Scheininfizierte 7±5 pg/ml).

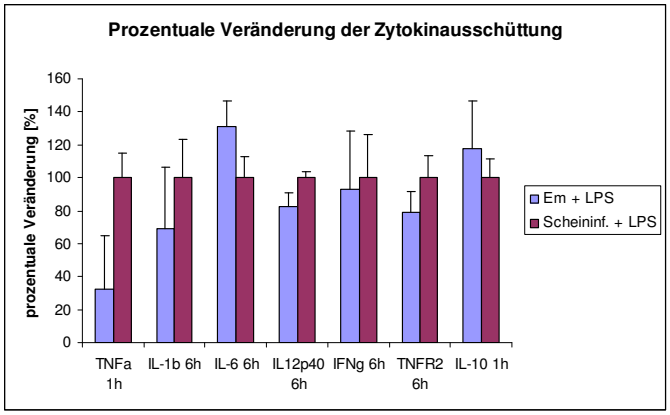


Abb.49: Prozentuale Veränderung der Zytokinausschüttung zwischen *E. multilocularis*-infizierten (Em, n=7) und scheininfizierten (Scheininf.) DBA/1-Mäusen (n=6) nach LPS-Injektion. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler.

Die prozentuale Veränderung der Zytokinausschüttung zwischen *E. multilocularis*- und scheininfizierten DBA/1-Mäusen nach LPS-Injektion wurde nach einer Stunde für TNFα und IL-10 sowie für die restlichen Zytokine nach sechs Stunden ermittelt. Dafür wurde die Zytokin-Konzentration der scheininfizierten Mäuse auf 100% gesetzt (Abb.49).

E. multilocularis-infizierte Mäuse zeigten eine Stunde nach der Injektion von LPS im Vergleich zu scheininfizierten Tieren mit LPS-Injektion eine signifikante Verringerung von TNFα im Plasma. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten *E. multilocularis*-infizierte Mäuse tendenziell weniger IL-1β, IL-12p40 und TNFR2 im Plasma als die scheininfizierten Kontrollen. Hingegen waren die Zytokine IL-10 und IL-6 eine bzw. sechs Stunden nach LPS-Gabe bei den *E. multilocularis*-infizierten Mäusen verglichen mit den scheininfizierten Kontrollen leicht erhöht.

3.2.4.2 Überlebensrate und Nachweis der *E. multilocularis* Infektion

Einen Tag nach der LPS- bzw. PBS-Injektion wurden die mit *E. multilocularis* infizierten DBA/1-Mäuse obduziert, um die Infektion zu bestätigen.

Dabei konnten bei allen Tieren zwölf Wochen nach der Infektion Metacestoden von *E. multilocularis* auf der Leber und im Peritoneum gefunden werden. Alle Metacestoden hatten bereits Protoscolices gebildet. Das Gewicht der Metacestoden betrug dabei durchschnittlich 0,4 g (von 0,16 g bis 1,02 g). In Form und Gestalt waren die Metacestoden und Protoscolices denen aus *Meriones* oder *Gerbillus* identisch, die Metacestoden waren allerdings in ihrer Größe und der Anzahl der Lokalisationsherde deutlich verringert.

In den ersten 24 Stunden nach der LPS-Injektion starben zwei von sieben der mit *E. multilocularis* infizierten Tiere, wohingegen von den scheininfizierten Tieren vier von sechs starben. Alle Tiere mit PBS-Injektion überlebten den Versuch.

3.2.5 Sepsisversuch mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/2-Mäusen

Für den Sepsisversuch wurden weibliche DBA/2-Mäuse verwendet, die zuvor i. p. mit *E. mulitlocularis* infiziert wurden (20000 Protoscolices in einem ml Metacestodensuspension). Die erste Blutabnahme zur Zytokinbestimmung erfolgte 29 Wochen nach der Infektion. Der Sepsisversuch fand 30 Wochen nach der Infektion statt. Zur Auslösung der LPS-induzierten Sepsis bekamen die Mäuse eine subletale Dosis von 3 µg *E. coli*-LPS pro g Körpergewicht i. p. verabreicht. Als Kontrollen dienten scheininfizierte Tiere. Die weiteren Blutabnahmen zur Plasmagewinnung erfolgten eine und sechs Stunden nach der Injektion von LPS.
Bei den DBA/2 Mäusen wurde das Überleben über drei Tage verfolgt, wonach die Tiere obduziert wurden.

3.2.5.1 Zytokinproduktion

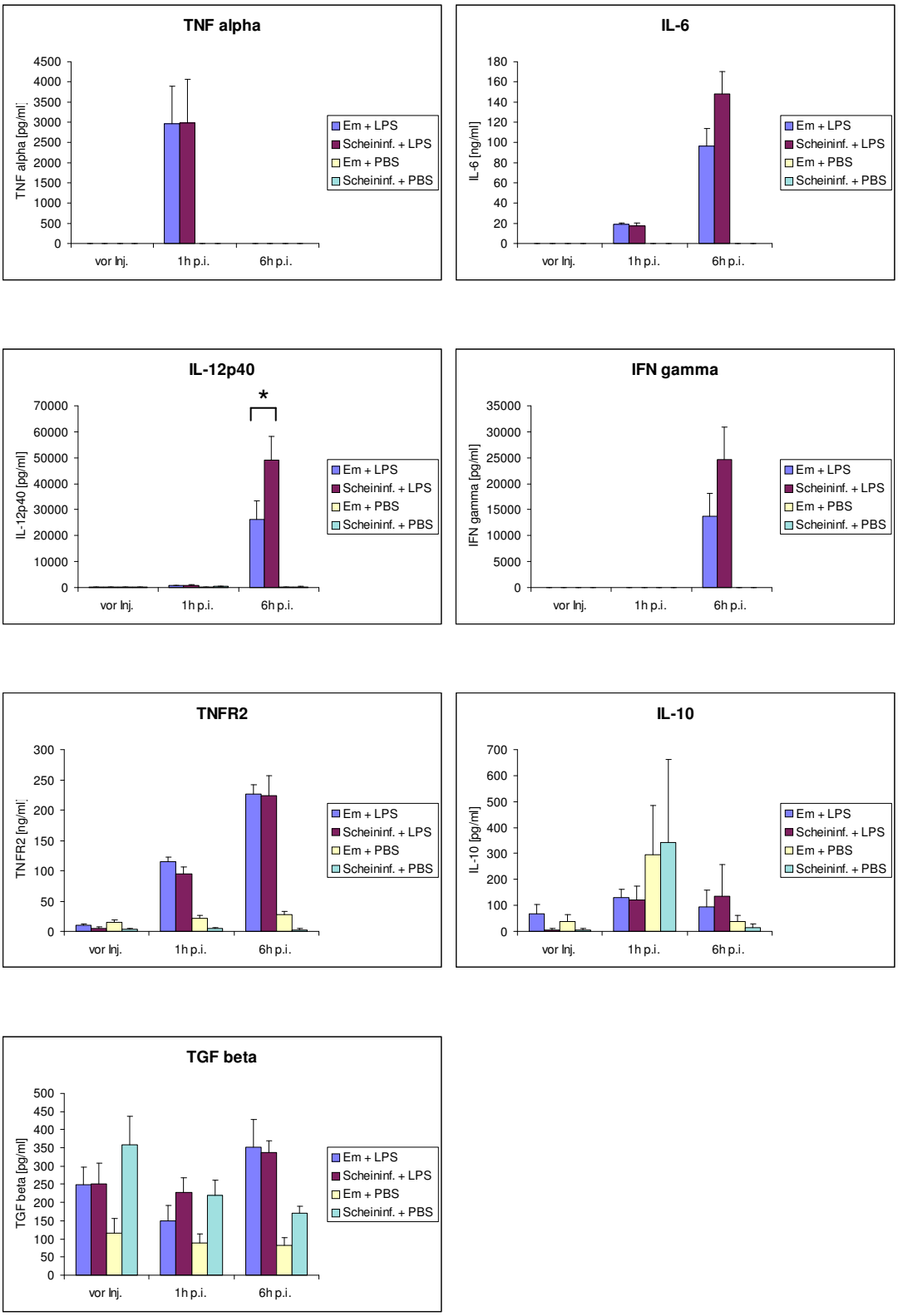


Abb.50: Zytokinproduktion von *E. multilocularis* (Em)- und scheininfizierten (Scheininf.) DBA/2-Mäusen vor der PBS- bzw. LPS-Injektion (vor Inj.), sowie 1 und 6 h nach der LPS-Gabe (1 h p. i., 6 h p. i.). Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05). (aM ± SEM)

TNFα ließ sich nur eine Stunde nach LPS-Injektion im Plasma nachweisen (Abb.50). Dabei hatten *E. multilocularis*- und scheininfizierte Mäuse etwa dieselbe TNFα-Konzentration (2966±921 pg/ml im Vergleich zu 2981±1083 pg/ml).

Die maximale IL-6-Konzentration wurde sechs Stunden nach LPS-Gabe gemessen, wobei *E. multilocularis*-infizierte Tiere (96,5±17,7 ng/ml) tendenziell weniger IL-6 als scheininfizierte Tiere (148,4±21,5 ng/ml) hatten. Eine Stunde nach Injektion war die mittlere IL-6-Konzentration bei *E. multilocularis*- und scheininfizierten Mäusen etwa gleich (17,6±2,5 ng/ml verglichen zu 18,6±2,0 ng/ml). Vor der LPS-Injektion konnte kein IL-6 detektiert werden.

Sechs Stunden nach LPS-Injektion hatten *E. multilocularis*-infizierte Tiere eine signifikant geringere Konzentration von IL-12p40 im Plasma (26164±7214 pg/ml) als scheininfizierte Mäuse (48914±9312 pg/ml). Eine Stunde nach der Injektion produzierten sowohl die *E. multilocularis*- als auch die scheininfizierten Mäuse etwa gleich hohe Konzentrationen von IL-12p40 (758±226 pg/ml, 997±226 pg/ml), die signifikant höher als die der PBS-Kontrollen waren (289±16 pg/ml, 485±103 pg/ml). IL-12p40 wurde bereits vor der LPS-Injektion konstitutiv bei *E. multilocularis*- und scheininfizierten Mäusen produziert (130-452 pg/ml).

Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten *E. multilocularis*-infizierte Tiere tendenziell weniger IFNγ im Plasma als die scheininfizierten Mäuse (13748±4405 pg/ml gegenüber 24697±6101 pg/ml). Zu einer signifikanten Zunahme der IFNγ-Konzentration verglichen mit den PBS-Kontrollen kam es erst sechs Stunden nach LPS-Injektion (0-10 pg/ml). Vor der Injektion und eine Stunde danach konnte bei einigen Tieren, unabhängig von der Behandlung, geringe Mengen an IFNγ gemessen werden (0-56 pg/ml).

Die TNFR2-Konzentration wurde bei Mäusen mit einer *E. multilocularis*-Infektion im Vergleich zu scheininfizierten Tieren vor der LPS-Injektion signifikant erhöht vorgefunden (13±2 ng/ml gegenüber 5±1 ng/ml). Auch eine Stunde und sechs Stunden nach PBS-Injektion hatten *E. multilocularis*-infizierte Tiere (22±5 ng/ml und 27±5 ng/ml) signifikant höhere TNFR2-Werte als die scheininfizierten Kontrollen (5±2 ng/ml und 3±2 ng/ml).

Dabei hatten nach LPS-Injektion *E. multilocularis*- (nach einer Stunde 115±8 ng/ml, nach sechs Stunden 227±15 ng/ml) und scheininfizierte Tiere (nach einer Stunde 95±12 ng/ml, nach sechs Stunden 225±33 ng/ml) ähnlich hohe TNFR2-Werte. Die Injektion von LPS erhöhte bereits eine Stunde nach Injektion die TNFR2-Konzentration signifikant gegenüber den Kontrollen, diese war nach sechs Stunden maximal.

Vor der Injektion von LPS hatten *E. multilocularis*-infizierte Tiere signifikant mehr IL-10 im Plasma als scheininfizierte Tiere (55±22 pg/ml gegenüber 6±4 pg/ml). Allerdings war dieser Effekt eine und sechs Stunden nach PBS-Injektion nicht mehr nachweisbar. Die Injektion von LPS führte zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Zunahme der IL-10-Konzentration im Vergleich zu den PBS-Kontrollen.

TGFβ wurde von allen Tieren schon vor der LPS-Injektion produziert, wobei unabhängig von der Behandlung relativ große Schwankungen auftraten. Sowohl eine als auch sechs Stunden nach LPS-Injektion unterschieden sich *E. multilocularis*-infizierte Tiere (149±44 pg/ml, 353±76 pg/ml) nicht von scheininfizierten LPS-behandelten Tieren (227±40 pg/ml, 339±30 pg/ml). Hingegen hatten scheininfizierte Tiere signifikant mehr TGFβ (nach einer Stunde 220±41 pg/ml, nach sechs Stunden 171±20 pg/ml) als *E. multilocularis*-infizierte Tiere nach jeweiliger PBS-Injektion (nach einer Stunde 90±24 pg/ml, nach sechs Stunden 82±21 pg/ml). Sechs Stunden nach der LPS-Injektion hatten LPS-behandelte Tiere (*E. multilocularis*-infizierte 353±76 pg/ml, scheininfizierte Tiere 339±30 pg/ml) signifikant höhere TGFβ-Werte als die PBS-Kontrollen (*E. multilocularis*-infizierte 82±721 pg/ml, scheininfizierte Tiere 171±20 pg/ml).

3.2.5.2 Verlauf der Körpertemperatur

Die Messung der Temperatur wurde einen Tag vor der LPS-Injektion sowie sechs Stunden nach erfolgter LPS-Injektion durchgeführt.

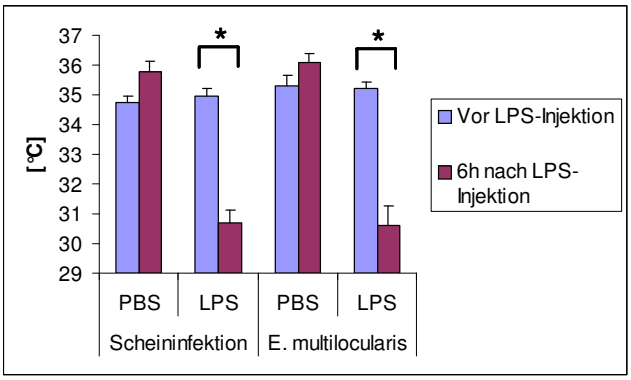


Abb.51: Temperaturverlauf bei DBA/2-Mäusen vor sowie 6h nach LPS- bzw. PBS-Injektion. Die Mäuse waren mit Metacestodengewebe von *E. multilocularis* infiziert, als Kontrollen dienten scheininfizierte Tiere (Scheininfektion + PBS n=5, Scheininfektion + LPS und *E. multilocularis* + PBS n=6, *E. multilocularis* + LPS n=7). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikante Unterschiede wurden nach Wilcoxon/Kruskal-Wallis ermittelt (*p<0,05).

Durch die Injektion von LPS nahm die Körpertemperatur bei scheininfizierten und *E. multilocularis*-infizierten Mäusen signifikant um 4,3 bzw. 4,6°C auf annähernd dieselbe Körpertemperatur (30,7 sowie 30,6 °C) ab (Abb.51). Hingegen stieg die Temperatur bei Mäusen, die PBS verabreicht bekamen, leicht an (bei scheininfizierten um 0,8°C auf 35,8°C bzw. bei *E. multilocularis*-infizierten Mäusen um 1°C auf 36,1°C). Vor der LPS-Injektion betrug die Körpertemperatur bei allen Gruppen etwa 35°C.

3.2.5.3 Überlebensrate und Nachweis der *E. multilocularis*-Infektion

Das Überleben der DBA/2-Mäuse wurde über 72 Stunden nach LPS-Gabe verfolgt. Verstorbene, mit *E. multilocularis* infizierte Tiere wurden obduziert, um die Infektionslast und die Lokalisation des Metacestoden zu bestimmen. Des Weiteren wurde der Metacestode auf das Vorhandensein von Protoscolices untersucht.

A) B)

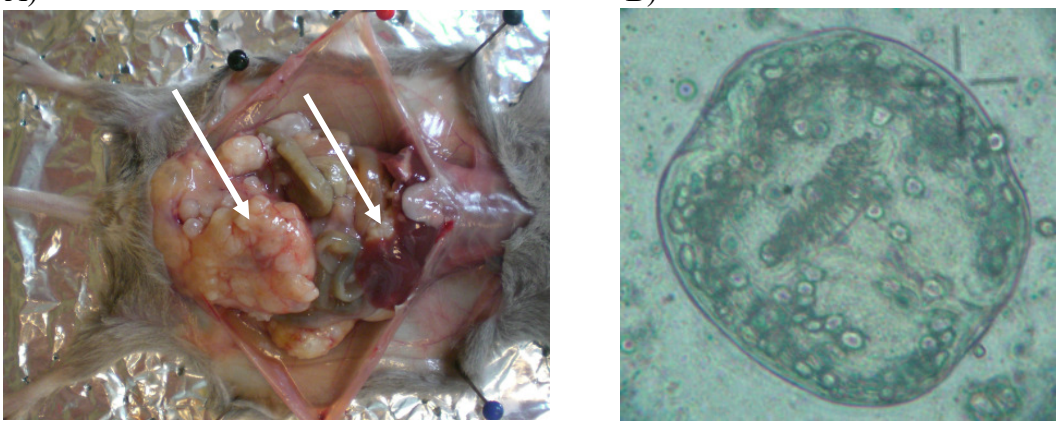


Abb.52: Metacestodengewebe (A, Pfeile) in einer mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/2-Maus, sowie ein daraus isolierter Protoscolex (B).

Die Infektion der DBA/2-Mäuse mit *E. multilocularis* war bei allen Mäusen erfolgreich. Ein halbes Jahr nach der Infektion betrug das mittlere Metacestodengewicht 3,4 g (von 0,8 g bis 9,7 g), wobei sich in allen Mäusen Protoscolices gebildet hatten. Die Abb. 52 zeigt beispielhaft eine mit *E. multilocularis*-infizierte DBA/2-Maus (A) und einen aus deren Metacestodengewebe isolierten Protoscolex (B). Die Lokalisation des Metacestodengewebes war vor allem im Peritoneum, aber auch auf der Leber. Bei einigen Tieren bildeten sich zusätzlich am Einstichsort subcutan kleinere Metacestoden. Form und Gestalt der Metacestoden und der Protoscolices entsprach denen, welche in *Meriones* oder *Gerbillus* wuchsen. Das Verhältnis der Metacestodengröße und deren Lokalisationsherde bezogen auf die Größe der DBA/2 Mäuse entsprach etwa denen einer 3-4 Monate lang infizierten *Gerbillus* oder *Meriones*. Bei allen mit *E. multilocularis*-infizierten Mäusen konnte eine Hepatosplenomegalie festgestellt werden.

Zwischen dem Metacestodengewicht und der beobachteten Zytokinausschüttung gab es keine Korrelation. Zudem korrelierte das Metacestodengewicht weder mit der Temperaturabnahme, noch mit dem Überleben der Mäuse.

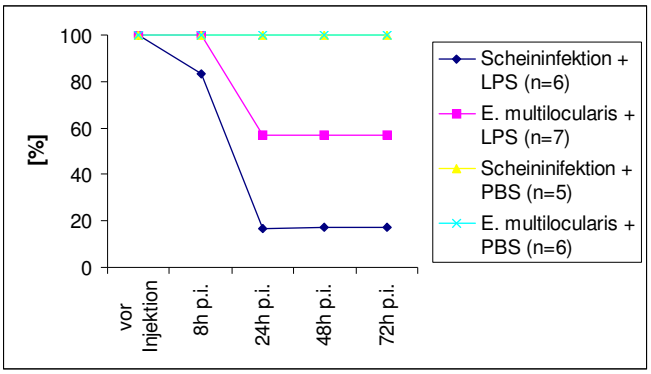


Abb.53: Überlebensrate der DBA/2-Mäuse über 72 h nach der Injektion von PBS oder LPS bei vorhandener *E. multilocularis*-Infektion oder Scheininfektion.

Von sieben Tieren mit einer vorhandenen *E. multilocularis*-Infektion starben nach der LPS-Gabe drei Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden (Abb. 53). Bei den scheininfizierten Tieren (n=6) starb bereits acht Stunden nach LPS-Injektion das erste Tier, vier weitere starben innerhalb von 24 Stunden. Alle Tiere, die PBS erhielten (Scheininfektion n=5, *E. multilocularis*-Infektion n=6), überlebten den Versuch.

4 Diskussion

4.1 Sepsisversuche mit *L. sigmodontis*-infizierten Mäusen

4.1.1 Sepsisversuch durch LPS-Injektion

Die Sepsis ist eine oft tödlich endende systemische Entzündungsreaktion, die durch das LPS gram-negativer Bakterien ausgelöst werden kann. Dabei wird durch die LPS-induzierte Aktivierung des TLR4 eine Entzündungsantwort hervorgerufen, die durch die Zytokine TNFα, IL-1, IL-6, IL-12 und das Chemokin IL-8 (CXCL8) vermittelt wird. Zudem führt die LPS-Injektion zu Fieber oder Hypothermie sowie Neutrophilie, Lymphopenie und Monozytopenie. In dieser Arbeit wurde eine LPS-Dosis von 4 µg *E. coli*-LPS pro g Körpergewicht gewählt, die in den verwendeten C57BL/6-Mäusen subletal ist. So wurden in C57BL/6-Mäusen 10 µg pro g Körpergewicht i. p. injiziert, um einen LPS-Schock auszulösen (Pawlinski et al. 2004), wohingegen eine LPS-Toleranz gewöhnlich mit einer Dosis von 1 µg pro g Körpergewicht ausgelöst wird (Lehner et al. 2001).

Die Injektion einer subletalen Dosis von LPS in immunkompetente Mäuse führte in unseren Versuchen nach sechs Stunden zu einer Abnahme der Lymphozytenanzahlen im peripheren Blut, v. a. zytotoxischer T-Zellen, B-Zellen und T_H-Zellen, und zu einer signifikanten Zunahme der Granulozytenzahl. Durch die LPS-Injektion kam es auch zu höheren Konzentrationen der T_H1- und T_H2-Zytokine IFNγ, TNFα, IL-6, IL-12p40, TNFR2 und IL-10. Dabei nahm die Temperatur der Mäuse um ca. 4°C ab und ein Drittel der Versuchstiere starben. Mit der gemessenen Hypothermie und der Leukozytose sind somit zwei der SIRS-Kriterien nachgewiesen worden, die für eine Sepsis typisch sind (DeFranco et al. 2006). Um festzustellen, ob die mehrfache Blutabnahmen bei Mäusen den LPS-Effekt verstärkt hatten, wurden solche Tiere verglichen mit Mäusen, denen lediglich PBS verabreicht wurde. Bei diesen Tieren wurde keine veränderte Zytokinkonzentrationen festgestellt und die Körpertemperatur blieb ebenfalls konstant.

4.1.2 Mikrofilarien-infizierte Mäuse

Eine vorangegangene Injektion von Mikrofilarien in immunkompetente C57BL/6-Mäuse führte dazu, dass eine an sich subletale Dosis von *E. coli*-LPS den Verlauf der Sepsis letal gestaltete. Verglichen mit den scheinbehandelten Tieren, die ebenfalls LPS bekamen, konnte sechs Stunden nach der Injektion eine signifikante Temperaturabnahme bei den Mikrofilarien-infizierten, LPS-behandelten Tieren festgestellt werden. Diese ging einher mit einer signifikanten Erhöhung der Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IFNγ, TNFα, IL-6 und IL-12p40, einer signifikanten Zunahme der Monozytenpopulation im peripheren Blut und einer vermehrten Expression des Oberflächenmarkers CD49B, der spezifisch für NK-Zellen ist, sowie des Oberflächenmarkers CD97, der auf Granulozyten und aktivierten T-Zellen vorkommt.

Da die alleinige Injektion von Mikrofilarien in immunkompetente Mäuse dazu führte, dass einerseits Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen vermehrt im peripheren Blut zu finden waren, aber auch die IFNγ-, IL-12- und MIG-Konzentration im Plasma anstieg, kann davon ausgegangen werden, dass eine T_H1-Immunantwort durch die Mikrofilarien induziert worden ist, die jedoch für die Mäuse nicht letal war. Die Induktion einer T_H1-Immunantwort durch Mikrofilarien wurde schon früher beschrieben (Lawrence et al. 1994) und geht zumindest bei *B. malayi* auf den von ihr produzierten Serin-Protease-Inhibitor (Serpin, BM-SPN-2) zurück, der in Wirtszellen die Freisetzung von IFNγ hervorruft (Zang et al. 2000). Andererseits kann IFNγ auch indirekt durch degenerierte Mikrofilarien induziert werden, wenn nämlich deren *Wolbachia*-Endosymbionten freigesetzt werden, die dann letztlich eine T_H1-Immunantwort induzieren (Taylor et al. 2000, Cross et al. 2001). Die Wolbachien, gram-negative Bakterien aus der Gruppe Rickettsiales, sind abundant in der Hypodermis bestimmter Filarienarten. Besonders bei den Filarienweibchen sind sie für die Fertilität sowie die Vitalität dieser Nematoden obligat. Das WSP (*Wolbachia* surface protein) ist in der Lage *in vitro* die IL-12-Produktion von PBMC zu erhöhen (Brattig et al. 2000), was die beobachtete Zunahme der IL-12p40-Konzentration durch Infektion mit Mikrofilarien erklären könnte. Außerdem stimuliert *Wolbachia* die TNFα-, MIP-2- und KC-Produktion von Neutrophilen (Gillette-Ferguson et al. 2004). KC und TNFα waren in unseren Versuchen nach Injektion von LPS nachweisbar, lagen allerdings bei Tieren mit zusätzlicher Mikrofilarieninfektion signifikant höher als bei Scheininfizierten. KC ist homolog zum humanen IL-8 (Al-Qaoud et al. 2000), wirkt chemotaktisch und aktivierend auf Neutrophile (Lira et al. 1994) und wird wie IP-10 durch eine TNFα-Induktion synthetisiert (Ohmori et al. 1993).

Zu den Funktionen von IFNγ gehören weiterhin die Stimulierung der Monozyten-Effektorfunktionen und die Akkumulierung von Makrophagen an der Entzündungsstelle. Die mit Mikrofilarien infizierten Tiere zeigten dementsprechend eine Zunahme der Monozyten im peripheren Blut. Die durch IFNγ ebenfalls hervorgerufene Produktion von Stickoxiden und Sauerstoffradikalen durch Makrophagen und andere Zellen kann die Vitalität von Mikrofilarien beeinträchtigen. So werden Mikrofilarien von *Onchocerca lienalis*, *L. sigmodontis* und *B. malayi* durch NO *in vitro* abgetötet (Taylor et al. 1996, Pfaff et al. 2000 B). Mikrofilarien von *O. lienalis* werden auch durch H_2O_2 abgetötet, während die von *L. sigmodontis* und *B. malayi* eine gewisse Resistenz gegen H_2O_2 besitzen (Taylor et al. 1996, Pfaff et al. 2000 B). Somit könnte durch eine verstärkte Aktivierung der Monozyten durch IFNγ der Mikrofilarienabbau und damit auch die Freisetzung der endosymbiontischen Wolbachien beschleunigt werden. Nach natürlicher Infektion mit *L. sigmodontis* zeigten IFNγ-ko-Mäuse eine doppelt so hohe Mikrofilarämie wie immunkompetente Mäuse (Saeftel et al. 2001). Dazu kommt, dass C57BL/6 als typischer „T_H1-Mausstamm“ gilt, dessen Makrophagen nach Stimulierung (z. B. durch LPS) höhere Werte an TNFα, IL-12 und IFNγ produzieren als BALB/c-Mäuse, die als eher T_H2-dominiert angesehen werden (Watanabe et al. 2004). Nach Injektion von *L. sigmodontis*-Mikrofilarien werden bei den Mikrofilarien-resistenten C57BL/6-Mäusen innerhalb einer Woche die Mikrofilarien aus dem peripheren Blut eliminiert, während sie bei den suszeptiblen BALB/c-Mäusen über einen Monat dort verbleiben (Pfaff et al. 2000 A). Als Hauptabbauort der Mikrofilarien wird die Lunge vermutet (Pfaff et al. 2000 A).

Des Weiteren werden durch IFNγ neutrophile Granulozyten und NK-Zellen stimuliert (Borish & Steinke 2003). Neutrophile Granulozyten vermitteln die Einkapselung von adulten *Litomosoides* in der Pleurahöhle (Al-Qaoud et al. 2000) und beeinflussen die Wurmlast und Knotenbildung (Saeftel et al. 2001). Abgestorbene Mikrofilarien in der vorderen Augenkammer und die damit assoziierte Immunreaktion sind bei der Onchozerkose die Ursache für die Augenpathologie. Auch hier konnten Saint Andre et al. zeigen (2002), dass eher die endosymbiontischen Wolbachien als *O. volvulus* selbst die Neutrophilen-Infiltration ins Stroma der Cornea induzieren. NK-Zellen wird eine entscheidende Rolle bei der Limitierung der Wurmlast von *L. sigmodontis* zugesprochen (Körten et al. 2002). Auch in Patienten mit der hyperreaktiven Form der Onchozerkose, Sowda genannt, wurde eine Zunahme der NK-Zellpopulation beobachtet (Brattig et al. 1987).

Ebenfalls durch IFNγ wird die Synthese von MIG in Makrophagen induziert, welches stimulierte T-Zellen anzieht, aber keinen Einfluss auf Neutrophile und Monozyten hat (Farber 1997, Liao et al. 1995) und die Rekrutierung und Funktion von Eosinophilen sogar hemmt

(Fulkerson et al. 2005). Obwohl die MIG-Konzentration ebenfalls signifikant durch die Injektion von Mikrofilarien im Plasma der Mäuse anstieg, konnte keine Veränderung der T-Zellpopulationen im peripheren Blut festgestellt werden.

Nach Injektion von LPS in Mikrofilarien-infizierte Tiere nahmen neben der Konzentration von IFNγ auch alle zusätzlich bestimmten Zytokin- und Chemokinkonzentrationen bis auf TNFR2, TGFβ und FGF signifikant zu im Vergleich zu den scheininfizierten Tieren. Von zentraler Rolle bei der Auslösung der Sepsis sind dabei die proinflammatorischen Zytokine TNFα, IL-1α und IL-1β, die hauptsächlich von mononukleären Phagozyten, Neutrophilen, Endothelzellen u. a. produziert werden (Borish & Steinke 2003). TNFα vermittelt dabei seine Effekte über TNFR1 und 2, wobei TNFR2 durch die LPS-Injektion ebenfalls in den verwendeten Mäusen verstärkt gebildet wurde. TNFα und IL-1β induzieren die Adhäsionsmoleküle (z. B. ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin) der Endothelzellen, wodurch die Granulozyten rekrutiert werden, adhärieren und ins Gewebe eindringen können. Die Freisetzung von Proteasen und toxischen Sauerstoffradikalen aktivierter Neutrophiler führt zur Hypotonie durch die auftretenden vaskulären Schäden des Endothels, aber auch durch einen negativen inotropen Effekt von TNFα. IL-1 fördert auch die Freisetzung von Histamin aus den Mastzellen, was zur Vasodilatation und zur Zunahme der vaskulären Permeabilität führt (Feghali & Wright 1997) und die Hypotonie zusätzlich verstärkt. Ein solcher Blutdruckabfall konnte in unseren Versuchen deutlich beobachtet werden.

Zudem verstärkt IL-1β die IL-2-Produktion, ein Effekt der durch die Injektion von LPS signifikant in unseren Mäusen erhöht wurde und durch eine vorherige Injektion von Mikrofilarien nochmals signifikant zunahm. IL-2 induziert die Proliferation der T-Zellen, wobei in den durchgeführten Experimenten die Anzahl immaturer $CD45^+IgD^-$-B-Zellen und B2-Zellen in LPS-injizierten Mäusen, unabhängig vom Infektionsstatus, im Vergleich zu den PBS-behandelten Tieren signifikant erhöht war, wohingegen allerdings mature $CD45^+IgD^+$-B-Zellen und B1-Zellen sowie $CD4^+$-, $CD8a^+$- und $CD8b^+$-T-Zellen verringert waren. Eine derartige Lymphopenie ist ebenfalls typisch für eine Sepsis (DeFranco et al. 2006).

Wie TNFα und IL-1β induziert IL-17 die Expression von ICAM-1, jedoch auf Fibroblasten. Dieses Zytokin wurde ebenfalls bei den Mikrofilarien-infizierten und LPS-behandelten Mäusen am stärksten produziert, war aber auch nach Injektion von LPS alleine schon signifikant höher als in Kontrollen. IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen dazu veranlasst, die Zytokine/Chemokine IL-6, IL-8 und GCSF freizusetzen und somit die Entzündungsantwort weiter triggert (Yao et al. 1995).

Die höchsten Zytokinkonzentrationen überhaupt wurden für IL-6 ermittelt und waren in den Mikrofilarien-infizierten und LPS-behandelten Mäusen sechs Stunden nach der LPS-Injektion im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht. IL-6 hat eine zentrale Rolle bei der Sepsis, da es die IL-1- und TNF-Synthese hemmt, wodurch die Hochregulierung der inflammatorischen Kaskade beendet wird (Borish & Steinke 2003, DeFranco et al. 2006). IL-6 ist ein guter Marker für die Sepsis, da die gemessenen Konzentrationen gut mit der Krankheitsschwere korrelieren, wobei IL-6 jedoch nicht Sepsis-spezifisch ist und zudem durch Immunsuppression und Kortikosteroide abgesenkt wird (Meisner 2005). IL-6 stimuliert die B-Zelldifferenzierung zu reifen Plasmazellen sowie T-Zellaktivierung, -differenzierung und -wachstum. Andererseits stimuliert IL-6 die Akute-Phase-Antwort der Leber und unterstützt die Aktivierung und Chemotaxis der Neutrophilen. IL-6 wird von vielen Zelltypen freigesetzt, wobei stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Epithelzellen die bedeutendsten sind. Zusammen mit IL-1β und TNFα ist IL-6 an der Änderung der Körpertemperatur beteiligt.

IL-12 wird vorwiegend von Monozyten, Makrophagen, weiteren Antigen-präsentierenden Zellen und B-Zellen produziert. Dabei ist die aktive Form das IL-12p70, ein Heteromer aus IL-12p40 und IL-12p35, wobei die IL-12p40 Produktion der IL-12p70-Antwort vorausgeht (Abdi 2002). Obwohl im Text bislang immer von IL-12p40 die Rede war, konnte der verwendete ELISA-Kit IL-12p40 als Monomer, aber auch als Homodimer (IL-12p80) detektieren. IL-12p70 aktiviert und induziert die Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinproduktion von NK-Zellen, was somit im Einklang zu den hier erzielten Ergebnissen steht. Dabei ist IL-12 das Schlüsselzytokin für die Induktion einer T_H1-Immunantwort, indem es $CD4^+$-Zellen veranlasst, IFNγ zu produzieren, und dem Einfluss von IL-4 entgegenwirkt (Seder et al. 1993, Manetti et al. 1993).

Durch die Injektion von LPS und v. a. durch eine vorherige Injektion von Mikrofilarien in die Mäuse, konnten nicht nur T_H1-typische Zytokine vermehrt vorgefunden werden, sondern auch die T_H2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13. Diese Zytokine werden vorwiegend von $CD4^+$-Zellen produziert, wobei IL-4 und IL-13 der T_H1-induzierten Immunantwort entgegenwirken. Die IL-4- und IL-5-Produktion erhöht die IgE- und IgA-Produktion und stimuliert Mastzellen und Eosinophile (Feghali et al. 1997). Sowohl IL-4 als auch IL-5 hemmen die Mikrofilarämie im Blut (Marechal et al. 1997, Saeftel et al. 2003, Hörauf et al. 2005), weshalb vermutet wird, dass deshalb Mikrofilarien eine T_H1-Immunantwort induzieren (Hörauf et al. 2005).

Die beiden regulatorischen Zytokine IL-10 und TGFβ haben die Fähigkeit, sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Immunantwort zu supprimieren und ein hyporeaktives Milieu zu etablieren. Die Konzentrationen beider Zytokine waren bei einer Injektion von Mikrofilarien bei nachfolgender LPS-Injektion signifikant erhöht im Vergleich zu den scheinbehandelten Kontrollen mit LPS-Injektion. IL-10 reduziert die Antigen-abhängige T-Zellproliferation, die Zytokinproduktion der NK-Zellen, mononukleären Phagozyten und T-Lymphozyten sowie die MHCII-Expression auf Monozyten (De Waal Malefyt et al. 1992). TGFβ inhibiert B-Lymphozyten und $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen, die Ig-Sekretion der B-Zellen sowie die Zytotoxizität der mononukleären Phagozyten und NK-Zellen. Während TGFβ chemotaktisch auf Makrophagen wirkt, ist IL-10 ein Wachstumsfaktor für zytotoxische T-Zellen (Feghali et al. 1997, Borish & Steinke 2003).
Die zentrale Bedeutung der Monozyten für den letalen Verlauf der Sepsis in Mikrofilarien- und LPS-injizierten Mäusen wird weiterhin klar, wenn die veränderten Chemokinkonzentrationen betrachtet werden. Die in diesen Mäusen signifikant im Vergleich zu den anderen Gruppen hochregulierte Konzentration von GMCSF ist an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt, indem Neutrophile stimuliert und die Effektorfunktionen von Eosinophilen und mononukleären Phagozyten aktiviert werden (Feghali et al. 1997).
Ebenso sind die Monozyten- bzw. Makrophagenprodukte MCP-1 und MIP-1α an der lokalen Entzündungsreaktion beteiligt. MIP-1α induziert *in vitro* die H_2O_2-Ausschüttung durch Neutrophile, während MCP-1 chemotaktisch auf Monozyten wirkt, Adhäsionsmoleküle und Oberflächenmoleküle (CD11c, CD11b) hochreguliert und die Freisetzung von IL-6 und IL-1 induziert (Jiang et al. 1992). Sowohl MCP-1 als auch MIP-1α induzieren zytolytische Zellen, so genannte CC chemokine-activated killer cells (Maghazachi et al. 1996). Beide Chemokine wurden durch die LPS-Injektion verstärkt in den Mäusen produziert und waren in Mäusen mit LPS- und Mikrofilarieninfektion signifikant höher als bei alleiniger LPS-Injektion.
Dies traf auch für das Chemokin IP-10 zu, das zusammen mit dem ebenfalls durch IFNγ induzierten MIG als Marker für den Verlauf einer SARS-Erkrankung verwendet wurde (Tang et al. 2005). Im Mausmodell wird IP-10 vorwiegend in der Leber und den Nieren nach der Injektion von inflammatorischen Agentien gebildet, u. a. IFNγ, und ist vermutlich an der Antwort der Leber und Nieren auf die systemische Entzündung beteiligt (Narumi et al. 1992).
Ebenfalls durch eine LPS-Injektion stieg die VEGF-Konzentration im Plasma der Mäuse an, das wiederum chemotaktisch auf Monozyten wirkt und prokoagulatorische Aktivitäten hat, aber auch ein Mitogen für vaskuläre Endothelzellen ist (Leung et al. 1989, Clauss et al. 1990).

Zusammengefasst scheint somit der letale Ausgang der Injektion einer subletalen Dosis von *E. coli*-LPS in Mikrofilarien-infizierte immunkompetente Mäuse darauf zurückzugehen, dass bereits Monozyten, Granulozyten und NK-Zellen durch die vorangegangene Mikrofilarieninfektion vermehrt im peripheren Blut vorkamen. Mit der Zunahme der IFNγ-Konzentration im Blutplasma wird die Expression des TLR4 (auch von MD-2 und MyD88) auf Monozyten und Makrophagen hochreguliert (Bosisio et al. 2002). Somit wirkt IFNγ der durch LPS ausgelösten verminderten Oberflächenexpression des TLR4 entgegen und erhöht die Reaktion der Monozyten auf LPS durch Phosphorylierung der IRAK (**i**nterleukin-1 **r**eceptor-**a**ssociated **k**inase), dem ersten Produkt nach MyD88 (Bosisio et al. 2002). Zudem fördert IFNγ die DNA-Bindungskapazität von NFκB, welche schließlich zu einer deutlich erhöhten TNFα- und IL-12-Produktion in IFNγ-sensitivierten Monozyten führt (Bosisio et al. 2002). Somit folgte auf die Injektion von LPS eine verstärkte Immunreaktion, die anhand der deutlich erhöhten Konzentrationen von IFNγ, TNFα, IL-6 und IL-12p40 sowie der Zunahme der Monozytenzahl und der Oberflächenmarker der $CD97^+$-Granulozyten und NK-Zellen im peripheren Blut Mikrofilarien- und LPS-injizierter Mäuse im Vergleich zu scheinbehandelten-LPS-behandelten Mäusen gezeigt werden konnte. Zudem wurden weitere Chemokine und Zytokine vermehrt produziert, die die Effektorfunktionen der Monozyten und Neutrophilen weiter stimulierten sowie Endothelzellen aktivierten. Demzufolge zeigten Mäuse mit Mikrofilarieninfektion und LPS-Behandlung bereits sechs Stunden nach der LPS-Injektion Symptome wie Hypotonie, was anhand einer deutlich verminderten Fließgeschwindigkeit des Blutes bei der Blutabnahme gesehen werden konnte, Lethargie und Hypothermie, die allesamt von den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β und TNFα vermittelt werden (Borish & Steinke 2003).

Da die Mikrofilarieninfektion nur einen Tag vor der Verabreichung von LPS erfolgte, handelt es sich somit ausschließlich um eine Veränderung der innaten Immunantwort. So konnten bei den Plasma-Antikörpern, deren Induktion der adaptiven Immunantwort zugerechnet wird, innerhalb dieses Zeitrahmens keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen festgestellt werden. Um Veränderungen der adaptiven Immunantwort zu erfassen, müsste sinnvollerweise ein für Mikrofilarien suszeptibler Stamm wie BALB/c verwendet werden.

4.1.3 Mikrofilarien-infizierte knockout-Mäuse

Die verwendeten ko-Mausstämme für die Sepsisversuche mit Mikrofilarien hatten Defekte im TNFR1 (p55), IFNγR und MARCO, dem Makrophagenrezeptor mit kollagener Struktur. Die TNFR1-ko-Mäuse exprimieren kein TNFRp55 auf ihren Zellen, während der TNFRp75 unverändert exprimiert wird. Die Mutation beeinflusst weder die T-Zell-Entwicklung noch die Lymphozytenpopulationen, allerdings ist der TNF-Signalweg stark gehemmt, so dass in T-Zellen kein NFκB induziert werden kann. Dadurch überleben TNFR1-ko-Mäuse normalerweise letale Dosen von Lipopolysacchariden oder *Staphylococcus aureus*-Enterotoxin B, während sie Infektionen mit *Listeria monocytogenes* nicht kontrollieren können und daran sterben (Pfeffer et al. 1993; Bohn et al. 1998). In unseren Versuchen überlebten 80% der Mäuse die LPS-Injektion unabhängig davon, ob sie Mikrofilarien injiziert bekommen hatten oder scheinbehandelt waren. Die Todesursache bei zwei verstorbenen Tieren war dabei vermutlich eher die Abnahme zu großer Blutvolumina als die Injektion an sich. Die Zytokine IFNγ, IL-6 und IL-12p40 waren bei den TNFR1-ko-Mäusen nach Mikrofilarieninfektion und LPS-Injektion immer deutlich geringer als bei den immunkompetenten Mäusen. Allerdings war die TNFα-Konzentration bei ihnen um ein Drittel höher, was vermutlich an der fehlenden Rückkopplung durch den TNFR1 lag.

Auch MARCO hatte einen wesentlichen Einfluss auf den Ausgang der LPS-induzierten Sepsis bei den Mikrofilarien-infizierten Mäusen. MARCO ist ein Typ-A Scavenger-Rezeptor, der auf Makrophagen, Dendritischen Zellen und Mikrogliazellen vorkommt und an den z. B. bakterielle Lipopolysaccharide binden (Grolleau et al. 2003). Die Injektion von Mikrofilarien und LPS in MARCO-ko-Mäuse bewirkte, dass IFNγ, TNFα, IL-6 und IL-12p40 signifikant anstieg im Vergleich zu den scheinbehandelten LPS-injizierten Mäusen. Im Vergleich zu den immunkompetenten Mäusen (Wildtyp) waren diese Zytokine jedoch nach Mikrofilarien- und LPS-Injektion um etwa zwei Drittel, bei IL-12 um ca. ein Viertel reduziert. Allerdings zeigten die MARCO-ko-Mäuse was IFNγ-, IL-6- und IL-12 anbelangt, die größten Veränderungen zwischen scheinbehandelten und Mikrofilarien-infizierten Tieren sechs Stunden nach Injektion von LPS. Trotz der vermindert ausgeschütteten T_H1-Zytokine starben drei der fünf mit Mikrofilarien- und LPS-behandelten Tiere, während die scheinbehandelten Tiere die LPS-Injektion überlebten. In zukünftigen Versuchen müsste geklärt werden, ob die MARCO-ko-Mäuse tatsächlich durch eine inflammatorische Reaktion starben, oder ob methodische Gründe, etwa die häufigen Blutabnahmen, dafür verantwortlich waren.

Die in unseren Versuchen eingesetzten IFNγR-ko-Mäuse haben zwar keine veränderte T-Zellantwort, allerdings ist die innate Immunantwort gestört, weshalb sie empfänglich für Infektionen mit *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* und dem *Vaccinia*-Virus sind (Huang et al. 1993, Bohn et al. 1998). Der Grundlevel an IFNγ war in IFNγR-ko-Mäusen auch ohne Injektion von Mikrofilarien oder LPS deutlich höher als im Wildtyp. Dennoch überlebten alle IFNγR-ko-Mäuse den Sepsisversuch, unabhängig von ihrer Behandlung. Dabei hatten die IFNγR-ko-Mäuse mit Mikrofilarien sechs Stunden nach der LPS-Injektion nur halb so hohe IFNγ-Konzentrationen wie die immunkompetenten Mäuse und auch die TNFα-, IL-6- und IL-12-Werte waren um ca. 90%, 95% bzw. 67% verringert.

Ähnliche Unterschiede zwischen immunkompetenten und ko-Mäusen ergaben auch die Messungen der Körpertemperatur. Bei allen Mäusen nahm nach Injektion von LPS die Körpertemperatur deutlich ab, was durch die Zytokine IL-1β und TNFα vermittelt wird. Allerdings war bei den Mikrofilarien-infizierten immunkompetenten Mäusen die Körpertemperatur sechs Stunden nach der LPS-Injektion am geringsten, wohingegen die Temperatur der IFNγR-ko- und MARCO-ko-Mäuse etwas höher lag, jedoch deutlich unterhalb der von scheinbehandelten Mäusen. Somit zeigte die Körpertemperatur die gleichen Veränderungen wie die Plasmaspiegel an TNFα. Demgegenüber zeigten LPS-behandelte TNFR1-ko-Mäuse keinen Unterschied in der Körpertemperatur zwischen Mikrofilarien- oder scheinbehandelten Tieren, obwohl sie die höchsten TNFα-Werte hatten. Da der TNF-Signalweg in den TNFR1-ko-Mäusen stark gehemmt ist, kann vermutet werden, dass somit auch der Einfluss von TNFα auf die Körpertemperatur verringert ist.

4.1.4 Mäuse mit weiblichen Filarien aus patenten Infektionen

Eine Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen hatte dieselben Auswirkungen wie eine Infektion mit Mikrofilarien, wenn die Tiere zwei Wochen danach mit LPS behandelt wurden. So waren in den Tieren mit weiblichen Filarien bereits vor der Injektion von LPS die Konzentrationen von IFNγ und IL-12p40 erhöht verglichen mit den scheinimplantierten Tieren. Nach der LPS-Behandlung waren die IFNγ-, TNFα-, IL-12p40-, TNFR2-, IL-10-, IL-6- sowie TGFβ-Spiegel in den Tieren mit weiblichen Filarien gegenüber den scheinimplantierten Kontrollen erhöht. Zudem nahm die Temperatur dieser Tiere deutlich stärker ab und alle Mäuse mit implantierten weiblichen Filarien starben nach LPS-Behandlung, während bei den scheinimplantierten Tieren nur eines von zehn durch die LPS-Injektion starb.

Dieser Ausgang des Sepsisversuchs wurde nicht erwartet, da die Filarieninfektion eigentlich zu einer T_H2-Immunantwort hätte führen müssen (Maizels et al. 2004) und dadurch der LPS-induzierten T_H1-Reaktion hätte entgegenwirken müssen.

Die Zytokinmessungen vor Injektion von LPS zeigten jedoch, dass im Plasma der Tiere mit implantierten Filarien weder das regulatorische Zytokin IL-10 noch TGFβ vermehrt auftrat, sondern umgekehrt die proinflammatorischen Zytokine IFNγ und IL-12 dominierten und somit eine T_H1-Polarisierung bestand. Eine drastisch höhere IFNγ-Konzentration wurde ebenfalls von Lamb et al. (2005) festgestellt, als sie in C57BL/6-Mäusen mit adulten *Litomosoides sigmodontis* eine Co-Infektion mit dem Protozoon *Leishmania major* setzten (Lamb et al. 2005). Dies könnte daran liegen, dass in C57BL/6-Mäusen, die für natürliche Filarieninfektionen nicht permissiv sind, diejenigen regulatorischen Zelltypen nicht induziert werden, die in suszeptiblen BALB/c-Mäusen das Überleben der Filarien sichern (Taylor et al. 2005, Lamb et al. 2005). Die von uns beobachteten erhöhten IFNγ- und IL-12p40-Plasmaspiegel gingen vermutlich auf die von den implantierten Weibchen ins Peritoneum freigesetzten Mikrofilarien zurück. Die implantierten Filarienweibchen stammten aus Baumwollratten, bei denen die Infektion schon das Stadium der Patenz erreicht hatte, d. h. blutzirkulierende Mikrofilarien waren bereits vorhanden. Von diesen Würmern kann jeder sofort nach Implantation ca. 20000 Mikrofilarien pro Tag freisetzen, was bei fünf implantierten Weibchen der doppelten Dosis an Mikrofilarien entspricht, die in den anderen Versuchen intravenös appliziert wurden. Allerdings gelangen nicht alle freigesetzten Mikrofilarien ins periphere Blut. Wahrscheinlich ging also die überschießende Immunreaktion auf IFNγ zurück, welches durch die freigesetzten Mikrofilarien induziert wurde. Dies führte wiederum zur Sensibilisierung der Monozyten, die dann verstärkt auf das LPS reagierten.

In zukünftigen Versuchen sollte also ermittelt werden, ob in einem T_H2-dominiertem Mäusestamm wie BALB/c (Watanabe et al. 2004), die Implantation von weiblichen Filarien aus patenten Infektionen ebenfalls den Verlauf einer LPS-induzierten Sepsis letal gestalten.

4.1.5 Mäuse mit Filarien aus postpatenten Infektionen

Die Annahme, dass die freigesetzten Mikrofilarien proinflammatorische Zytokine induzierten und nicht etwa auf die Implantation der Filarienweibchen zurückging, wurde im Vergleich zu den scheinimplantierten Tieren durch die Implantation von Filarienweibchen aus postpatenten Infektionen bestätigt. Nach Implantation und LPS-Behandlung änderte sich die Zytokinproduktion nicht und somit überlebten alle Tiere den Sepsisversuch. Dies war auch bei Implantation von männlichen Filarien der Fall. Zudem zeigte sich kein Unterschied in der

Körpertemperatur zwischen scheinimplantierten Mäusen und Tieren, die männliche oder weibliche Filarien aus postpatenten Infektionen implantiert bekommen hatten. Allerdings kann die vorherige Implantation von Filarienmännchen in Mikrofilarien-resistenten Mäusen zu einer Beschleunigung des Mikrofilarienabbaus führen (Hille 2003).

Interessanterweise konnten im Peritoneum, dem Habitat der implantierten Filarien, noch vereinzelte Mikrofilarien detektiert werden. Somit konnten die Filarienweibchen zwar noch in geringen Mengen Mikrofilarien freisetzen, diese traten aber nicht mehr in die Blutzirkulation ein oder wurden im Peritoneum oder in der Lunge abgebaut (Pfaff et al. 2000 A). Frühere Versuche bestätigten, dass intra peritoneal injizierte Mikrofilarien in deutlich geringerer Dichte ins periphere Blut gelangen, als Mikrofilarien, die direkt in die Blutzirkulation injiziert wurden (W. H. Hoffmann, persönliche Mitteilung).

4.1.6 Mäuse mit weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen

Nach Implantation von weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen war vor der LPS-Behandlung keiner der gemessenen Immunparameter (IFNγ, TNFα, IL-6, IL-12p40, TNFR2, IL-10) verglichen mit scheinimplantierten Tieren im Plasma erhöht. Darüberhinaus konnte sogar die inflammatorische Reaktion auf das injizierte LPS im Vergleich zu den scheinimplantierten Kontrollen deutlich supprimiert werden. So waren v. a. die IFNγ-, aber auch die TNFα-, IL-6- und IL-12p40-Plasmaspiegel deutlich vermindert. Demzufolge überlebten auch alle Mäuse mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen den Sepsisversuch.

IL-10 wurde von den Mäusen mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen nicht verstärkt produziert. Allerdings konnte die Bedeutung von IL-10 bei der Sepsis indirekt durch Einsatz von IL-10-ko-Mäusen gezeigt werden. Solche Tiere erhielten ebenfalls Filarienweibchen aus präpatenten Infektionen. Nach LPS-Behandlung unterschieden sie sich in ihrem Zytokinprofile nicht von den scheinimplantierten Kontrollen. Sechs Stunden nach der LPS-Injektion lagen die Werte von TNFα noch immer im Nanogrammbereich. Dieser hohe Plasmaspiegel übertraf sogar diejenigen von Mäusen, die mit Mikrofilarien infiziert und mit LPS behandelt worden waren. Die starke und verlängerte Wirkung von TNFα lag an der fehlenden Regulation durch IL-10, welches an der Beendigung einer Initialen Entzündungsreaktion beteiligt ist. Demzufolge starben alle IL-10-ko-Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach Injektion von LPS.

4.1.7 Zusammenfassung der Sepsisversuche mit *L. sigmodontis*

Sowohl die intravenöse Injektion von Mikrofilarien als auch die Implantation von adulten Filarienweibchen aus patenten Infektionen führte in Kombination mit einer LPS-Behandlung zu einer letal verlaufenden Sepsis. Hingegen hatten die männlichen Filarien oder weiblichen Würmer aus postpatenten Infektionen keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Zytokinausschüttung im peripheren Blut. Eine Implantation von weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen konnte sogar die Freisetzung von T_H1-typischen Zytokinen ins periphere Blut supprimieren.

Betrachtet man diese Ergebnisse aus biologischer Sicht, so muss man berücksichtigen, dass sich in natürlichen Infektionen zuerst aus den infektiösen dritten Larven die adulten Filarien entwickeln. In den Filarienweibchen dauert die Embryogenese 18 Tage (Mössinger & Wenk 1986). Somit haben die weiblichen Würmer Zeit, die Immunantwort ihrer Wirte zu modulieren, bis schließlich die Mikrofilarien freigesetzt werden. Dementsprechend wurde durch Lawrence et al. (1994) eine T_H2-Polarisierung durch *B. malayi*-Weibchen nachgewiesen, die aber durch die Mikrofilarienfreisetzung moduliert werden kann. In unseren Versuchen wurden jedoch weibliche Filarien aus patenten Infektionen eingesetzt, die somit direkt nach der Implantation Mikrofilarien freisetzten, ohne dass die Weibchen die Immunantwort des Wirtes zuvor modulieren konnten. Deshalb sollte in einem zukünftigen Versuch geklärt werden, ob eine vorherige Implantation von adulten Filarienweibchen aus präpatenten Infektionen, die also noch keine Mikrofilarien freisetzen, den negativen Effekt von später injizierten Mikrofilarien auf eine LPS-induzierte Sepsis kompensieren können. Immerhin kann eine derartige Vorbehandlung in Mäusenstämmen, die sich aufgrund genetischer Determinanten resistent gegenüber injizierten Mikrofilarien verhalten, in der Änderung des Phänotyps resultieren. So führte eine vorherige Implantation von nur einem adulten *L. sigmodontis*-Weibchen bei drei verschiedenen normalerweise resistenten Inzuchtstämmen zur Permissivität gegenüber nachfolgend injizierten Mikrofilarien (Hoffmann et al. 2001 A)

Ein weiterer Faktor in diesem Geschehen stellten die endosymbiontischen Wolbachien dar. Sowohl Mikrofilarien, als auch die adulten Filarien von *L. sigmodontis* beherbergen diese Symbionten. Beim Absterben von Mikrofilarien und bei der Freisetzung von Mikrofilarien durch adulte Weibchen können diese Endosymbionten frei werden (Taylor et al. 2001).

Es ist bekannt, dass Wolbachien von Filarien an diesen Entzündungsreaktionen beteiligt sind und über den TLR2 und 4 wirken (Taylor et al. 2000, Brattig et al. 2000, 2004). Turner et al. (2006) zeigten, dass lösliche Extrakte adulter Weibchen von *B. malayi*, die ebenfalls *Wolbachia*-Endosymbionten besitzen, die TLR4-Expression auf Makrophagen verringern können. Zudem hemmt SEA, das **S**oluble **E**gg **A**ntigen von *S. mansoni*, die Fähigkeiten der TLR Dendritischer Zellen, auf LPS zu reagieren (Kane et al. 2004, Pearce et al. 2006). In Folge der LPS-induzierten proinflammatorischen Immunreaktion kommt es zu einer anti-inflammatorischen Immunantwort, die IL-4, IL-10, IL-13, TGFβ und den IL-1Ra einschließt, wodurch eine überschießende Immunreaktion verhindert werden soll (Taylor et al. 2001). So kann durch subletale Dosen von LPS eine LPS-Toleranz induziert werden, durch die eine folgende letale Dosis an LPS überlebt wird (Mengozzi & Ghezzi 1993). Dies liegt an der Herunterregulierung der TLR4-Expression bei dessen konstanter Stimulierung und somit einer verringerten Aktivierung von NFκB.
Da jedoch die Mikrofilarieninfektion die IFNγ-Ausschüttung in unseren Tieren induzierte, wird dieser TLR4-Herunterregulierung auf Monozyten entgegengewirkt und stattdessen TLR4 verstärkt exprimiert (Bosisio et al. 2002).
Eine chronische Blutinfektion wie Malaria oder auch TLR-Liganden hemmen die Cross-Präsentation von aktivierten Dendritischen Zellen (Wilson et al. 2006). Dadurch können Dendritische Zellen keine neu angetroffenen extrazellulären Antigene über den MHCI präsentieren, eine Eigenschaft, die den Dendritischen Zellen vorbehalten ist. Ansonsten werden extrazelluläre Moleküle nur über den MHCII präsentiert. Da es bei systemischen Entzündungen im Blut trotz ständiger TLR-Aktivierung zu einer Immunsupprimierung kommt, können reife Dendritische Zellen zudem schlechter neue Antigene über MHCII präsentieren und somit auch weniger CD4/CD8-Zellen aktivieren. Mikrofilarien von *B. malayi* können zudem die Antigenpräsentation durch Dendritische Zellen direkt hemmen, indem sie bei ihnen Apoptose auslösen, aber auch deren Fähigkeiten hemmen, in $CD4^+$-Zellen die IL-12- und IFNγ-Produktion zu fördern (Semnani et al. 2003). Jenson et al. (2002) zeigten zudem, dass Mikrofilarien von *B. malayi* die Apoptose von $CD4^+$-T-Zellen induzieren.

Somit könnten Mikrofilarien auch an der Immunsupprimierung durch die Initiierung der Apoptose in $CD4^+$- und Dendritischen Zellen beteiligt sein, während die adulten Filarienweibchen regulatorische Immunantworten fördern. Die chronischen Verläufe bei Filariosen und die jahrelange Persistenz der Filarien geht also auf die Immunsuppression in deren Wirten zurück (Maizels & Lawrence 1991, Hörauf & Brattig 2002, Maizels et al. 2004).

Schon früher wurden bei Filariosen eine verminderte T-Zellproliferation (Piessens et al. 1980) sowie eine verringerte Produktion von IFNγ und IL-5 in patenten Infektionen festgestellt (Sartono et al. 1997). Diese Zytokine reduzieren bei natürlicher Infektion mit *L. sigmodontis* die Wurmlast (Saeftel et al. 2003). Für die Etablierung der Immunsuppression sind hingegen die regulatorischen Zytokine IL-10 und TGFβ von großer Bedeutung. Deren Plasmakonzentrationen waren zwar in unseren Versuchen nach Implantation der adulten Weibchen nicht erhöht, allerdings könnten sie im Peritoneum, dem Sitz der implantierten Adultwürmer, erhöht gewesen sein. Bei Onchozerkosepatienten vermitteln IL-10 und TGFβ die Hyporeaktivtät der T-Zellen und Antikörper gegen IL-10 und TGFβ konnten diese wieder aufheben (King et al. 1993, Doetze et al. 2000). Die IL-10-Produktion bei *S. mansoni*-infizierten Mäusen hemmte die Proliferation von T-Zellen und die IL-12-Freisetzung von CD40-Agonist-aktivierten Dendritischen Zellen (McKee et al. 2004). Sie konnte auf $CD4^+CD25^+$-regulatorische T-Zellen, die den Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (Foxp3) exprimieren, zurückgeführt werden (McKee et al. 2004). IL-10 unabhängige regulatorische Funktionen wurden für $CD4^+CD25^+$-, CTLA4- und GITR-exprimierende T-Zellen nachgewiesen, die im *L. sigmodontis*-Modell das Überleben der Parasiten durch die Supprimierung der Wirtsimmunantwort sichern, während Antikörper gegen CTLA4 und GITR die Parasitenlast deutlich reduzieren (Taylor et al. 2005). Überraschenderweise konnte bei *S. mansoni*-Infektionen in den Lymphatischen Organen, oder in der Leber, wo durch die Wurmeier Entzündungen hervorgerufen werden, keine Zunahme der natürlich vorkommenden $CD4^+Foxp3^+$-Zellen festgestellt werden (Baumgart et al. 2006). Allerdings nahm die Expression von CD103, ein Aktivierungsmarker für regulatorische T-Zellen, mit Fortschreiten der Infektion zu (Baumgart et al. 2006).

Neben regulatorischen T-Zellen sind auch alternativ aktivierte Makrophagen an der $CD4^+$-T-Zell-Hyporeaktivität beteiligt. So konnten Taylor et al. (2006) die Hyporeaktivität von $CD4^+$-T-Zellen und Thorax-Lymphknoten bei patenten Infektionen mit *L. sigmodontis* zumindest teilweise auf alternativ aktivierte $F4/80^+$-Makrophagen zurückführen. Interessanterweise war diese Makrophagenpopulation bei präpatenter Infektion auf die Pleurahöhle beschränkt, breitete sich jedoch nach der Freisetzung von Mikrofilarien auch auf die peripheren Thorax-Lymphknoten aus (Taylor et al. 2006).

Die Bedeutung dieser Zellpopulationen sollte in zukünftigen Experimenten im Sepsisversuch mit Mäusen, die weibliche Filarien aus präpatenten Infektionen bekommen hatten, untersucht werden. In jedem Fall wäre es außerdem von Vorteil, eine Methode zur Zytokinbestimmung zu verwenden, die weniger Plasmavolumen benötigt, wie z. B. die Luminex- oder FlowCytomix-Methode, bei der bis zu 20 Zytokine/Chemokine gleichzeitig mit maximal 50 µl Plasma bestimmt werden können.

Die deutlichen Unterschiede der Zytokinkonzentrationen der Luminex-Methode und dem ELISA in unseren Versuchen könnten an einer unterschiedlichen Affinität oder Spezifität der eingesetzten Antikörper liegen. Ähnliche Unterschiede wurden bereits von Mitchell et al. (2005) beschrieben, die zwei verschiedene ELISA-Kits, darunter den hier eingesetzten IFNγAN-18 verwendeten. In den Infektionsversuchen mit Mikrofilarien und LPS-Behandlung wurden die Zytokine in drei separaten Experimenten mittels ELISA gemessen und ergaben dabei jeweils etwa gleich hohe Werte. Die Zytokinbestimmung durch die Luminex-Methode (ausgeführt an der GBF Braunschweig) resultierte hingegen in deutlich niedrigeren Messergebnissen. Eine Verfälschung der Ergebnisse im ELISA durch technische Fehler, etwa abgelaufene Antikörper oder zu oft aufgetaute Standards, können in unseren ELISA-Messungen jedenfalls ausgeschlossen werden. Die gemessenen Proben waren zudem so verdünnt, dass sie im Standardbereich lagen und nicht darüber hinausgingen. Auch wenn die absolute Menge an Zytokinen somit nicht eindeutig quantitativ bestimmt werden konnte, so waren die Verhältnisse der Konzentrationen zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen doch nach beiden Methoden in etwa gleich.

4.2 Immunmodulation durch *E. multilocularis*

Ähnlich wie bei den Filarien persistiert auch der Metacestode des Fuchsbandwurms *E. multilocularis* jahrelang unbemerkt in seinen Wirten, ohne eine Pathologie zu verursachen (Gottstein & Hemphill 1997). Das progressive Wachstum im Zwischenwirt ist dabei nicht mit einer fulminanten Entzündungsreaktion und Organschäden verknüpft, sondern mit einer latenten unauffälligen Infektion (Hübner et al. 2006).

Ähnlich wie die Filarien induzieren Metacestoden von *E. multilocularis* eine Immunmodulation. In Experimenten mit C57BL/6-Mäusen reagierten Milzzellen zu Beginn der Infektion mit einer starken Proliferation auf *E. multilocularis*-Antigen, die mit einer Produktion von IFNγ, IL-2 und IL-5 einherging. Die T-Zellproliferation verringerte sich jedoch ab der 22. Woche p. i. (Emery et al. 1996). Während also eine starke Lymphozytenproliferation mit einem Schutz vor alveolärer Echinokokkose assoziiert ist, scheint eine T_H2-Immunantwort das Wachstum des Parasiten und den Krankheitsfortschritt zu fördern (Bresson-Hadni et al. 1989, Vuitton et al. 1989).

Exkretorische/sekretorische Produkte des Metacestoden verändern gezielt die Wirtsimmunantwort. Dabei handelt es sich um Substanzen, die mit Makrophagen und T-Zellen interferieren und dadurch deren Kapazität, Antigene zu präsentieren und somit die Lymphozytenproliferation zu stimulieren, verschlechtern (Dixon 1997). Walker et al. (2004) fanden ein immunmodulatorisch wirkendes Molekül von *E. multilocularis*-Metacestoden, Em492 genannt, welches die Milzzellproliferation hemmte. Extrakte des Metacestoden können aber auch die Degranulation von Basophilen, die Freisetzung von Histamin, IL-4 und IL-13 stimulieren (Aumüller et al. 2004). Protoscolices von *E. multilocularis* generieren außerdem *in vitro* supprimierende $CD8^+$-Zellpopulation (Kizaki et al. 1993).

In Patienten mit AE wurde die Entstehung von $CD4^+$-Gedächtniszellen behindert (Manfras et al. 2004). Eigene Ergebnisse wiesen im peripheren Blut von Patienten mit AE eine höhere Anzahl an $CD4^+CD25^+$-Zellen, mögliche regulatorische T-Zellen, nach (Hübner et al. 2006), die an der Etablierung eines hyporeaktiven Immunsystems beteiligt sein könnten.

Zytokinmessungen in AE-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten zudem, dass erhöhte TNFα-Konzentrationen mit einem progressiven Krankheitsverlauf assoziiert sind (Shi et al. 2004), aber bei Patienten mit abortiven Läsionen fehlen (Bresson-Hadni et al. 1994 B).

Während bei AE-Patienten die IFNγ-Produktion erhöht ist (Shi et al. 2004, Hübner et al. 2006), wird IL-12 im Vergleich zu Gesunden verringert produziert (Dreweck et al. 1999, Hübner et al. 2006). Gemeinsam mit einer rigorosen zellvermittelten Immunantwort sind diese T_H1-Zytokine

mit einer protektiven Immunreaktion gegen *E. multilocularis* assoziiert (Emery et al. 1998, Amiot et al. 1999, Vuitton 2003).

4.2.1 Sepsisversuch in *E. multilocularis*-infizierten Mäusen

Analog zu den Sepsisversuchen in C57BL/6-Mäusen mit den verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis,* wurden DBA/1- und DBA/2-Mäuse mit *E. multilocularis*-Metacestoden infiziert und nach Infestation der Metacestoden mit LPS bzw. PBS behandelt.

Obwohl die meisten gebräuchlichen Inzucht-Mausstämme suszeptibel für *E. multilocularis* sind (Liance et al. 1984), gibt es stammesspezifische Unterschiede in der Proliferation des Metacestoden und in der Neigung Protoscolices auszubilden (Nakaya et al. 1997). Für DBA/1 und DBA/2 konnte dabei eine normale Entwicklung der Metacestoden und der Protoscolices - vergleichbar der im natürlichen Zwischenwirt - gefunden werden (Nakaya et al. 1997). Dies wurde bei den durchgeführten Infektionen bestätigt, die im Gegensatz zu den transportalen Injektionen von Nakaya et al. (1997) durch Injektion direkt ins Peritoneum durchgeführt wurden.

Die DBA/1-Mäuse wurden 12 Wochen p. i. mit LPS behandelt, während die DBA/2-Mäuse davor schon ein halbes Jahr lang infiziert waren. Somit waren nach Emery et al. (1996) die DBA/1-Mäuse in einem frühen Stadium der Echinokokkose mit noch unveränderten Proliferationsraten der Milzzellen im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren. Hingegen befanden sich die DBA/2-Mäuse bereits in einem Stadium der Immunsuppression, das mit einem verstärkten Parasitenwachstum assoziiert ist.

Die Zytokinmessungen in den DBA/1-Mäusen vor der Injektion von LPS ergab gleiche Level an TNFα, IL-1β, IL-6, IL-12p40, IFNγ, TNFR2 und IL-10 im Blutplasma, unabhängig davon ob die Tiere mit *E. multilocularis* infiziert waren oder nicht. Dies spricht für eine Tolerierung des Parasiten ohne Entzündungsreaktionen. In Patienten mit AE gilt dagegen eine erhöhte Konzentration der beiden T_H1-Zytokine TNFα und IFNγ als Marker für eine progressive Erkrankung (Shi et al. 2004). Emery et al. (1996) konnten zeigen, dass Milzzellen von *E. multilocularis*-infizierten Mäusen sechs Wochen p. i. auf die Stimulation mit Metacestodenantigen verstärkt IFNγ, IL-2, IL-5 und IL-10 produzierten, wohingegen 22 Wochen nach der Infektion eine generelle Immunsuppression mit inhibierter Lymphozytenproliferation und Zytokinsekretion zu beobachten war.

Nach der Injektion von LPS gab es signifikante Unterschiede in der TNFα- und IL-6-Konzentration zwischen *E. multilocularis*-infizierten und scheininfizierten Tieren.

E. multilocularis-infizierte Tiere hatten eine Stunde nach der LPS-Injektion signifikant weniger TNFα und nach sechs Stunden tendenziell geringere Konzentrationen an IL-1β, IL-12p40 und TNFR2 als die scheininfizierten Kontrollen. Hingegen war die Konzentration an IL-6 in *E. multilocularis*-infizierten Mäusen sechs Stunden nach der LPS-Injektion im Vergleich zu den scheininfizierten Mäusen erhöht. Dieser Effekt trat interessanterweise auch nach PBS-Injektion auf. Keine Unterschiede gab es dagegen im IL-10- und IFNγ-Gehalt. Demzufolge schienen die proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-1β in den *E. multilocularis*-infizierten Mäusen in geringerem Maße gebildet worden zu sein, während IL-6, das die Freisetzung dieser beiden Zytokine hemmt, vermehrt produziert wurde. Somit kann auch in unseren Versuchen von einer gewissen Hyporeaktivität gegenüber LPS ausgegangen werden, die im Einklang mit der von Emery et al. (1996) beobachteten verminderten Zellproliferation und Zytokinausschüttung bei *E. multilocularis*-infizierten Mäusen steht. Allerdings waren in unseren infizierten Mäusen die Metacestodenherde noch sehr klein, was dafür spricht, dass die Immunsuppression noch nicht vollständig oder aber erst vor kurzer Zeit eingetreten war.

Die seit einem halben Jahr mit *E. multilocularis*-infizierten DBA/2-Mäuse hatten vor der Injektion von LPS signifikant höhere IL-10-Werte im Plasma als die scheininfizierten Kontrollen. Nach Injektion von LPS hatten die infizierten Tiere geringere IL-6-, IFNγ- und IL-12p40-Konzentrationen als die scheininfizierten Kontrollen. Dies führte allerdings nicht zu einer deutlichen Verbesserung der durch LPS ausgelösten septischen Symptome wie der Abfall der Körpertemperatur und auch die Überlebensrate war nicht eindeutig höher.
Höhere Konzentrationen von IL-10 wurden auch in Patienten mit AE gefunden (Wellinghausen et al. 1999) und gelten als Marker für einen progressiven Krankheitsverlauf (Godot et al. 1997). Dabei konnten hohe Konzentrationen dieses Zytokins in der Nähe des Metacestoden gefunden werden (Harraga et al. 2003). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-10, wie die Inhibierung der Makrophagenaktivierung oder die zytotoxischen Funktionen von Makrophagen (Howard & O´Garra, 1992), könnten zu der von uns beobachteten verminderten Produktion der T_H1-Zytokine nach Injektion von LPS geführt haben.
Da die Infektion sich nicht eindeutig positiv auf die Überlebensrate und die Körpertemperatur auswirkte, muss angenommen werden, dass *E. multilocularis* zwar in DBA-Mäusen wächst und proliferiert, aber dennoch schlechter angeht als in den natürlichen Zwischenwirten und somit eine verstärkte Immunantwort seitens der Wirte auf den Parasiten vorhanden ist.

4.2.2 Veränderte Zytokinausschüttung durch EmMed bzw. EmVes

Um den möglichen Einfluss exkretorischer/sekretorischer Substanzen des Metacestoden auf die veränderte Zytokinkonzentrationen *in vitro* zu überprüfen, wurden PBMC von gesunden Blutspendern mit Kulturüberstand von *E. multilocularis*-Metacestoden mit oder ohne Vesikel (EmVes bzw. EmMed) inkubiert und die Zytokine im Zellkulturüberstand gemessen. Um eine Hemmung der proinflammatorischen Zytokinsynthese nachzuweisen, wurde der *in vitro*-screening Assay von Laufer et al. (2002) in etwas abgeänderter Form übernommen. Dabei wurden die PBMC im Beisein der zu testenden Substanzen, EmMed und EmVes, mit LPS stimuliert und anschließend die Kapazität der Substanzen, die gemessenen Zytokine im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen ohne EmMed oder EmVes zu hemmen, ermittelt.

Wir konnten nachweisen, dass sowohl EmMed als auch EmVes bei co-kultivierten PBMC die LPS-induzierte Zytokinausschüttung von IL-12 und TNFα hemmt (Hübner et al. 2006). Darüberhinaus hemmten sowohl EmMed und EmVes dosisabhängig die spontane Produktion von IL-12.

TNFα

Bei der AE sind erhöhte TNFα-Konzentrationen mit schweren Gewebsschädigungen assoziiert (Shi et al. 2004), während abortive oder stabile Infektionsverläufe mit einer verringerten TNFα-Konzentration im Vergleich zu gesunden Blutspendern einhergehen (Bresson-Hadni et al. 1994 B, Hübner et al. 2006). Die reduzierte Produktion von TNFα könnte also eine Adaptation gegen eine mögliche Schädigung des Wirtes durch solche Entzündungsreaktionen sein. Sowohl EmMed und EmVes besitzen die Fähigkeit, TNFα, welches ein Schlüsselzytokin einer systemischen Inflammation darstellt, zu hemmen.

IL-12

Mit IL-12 wurde auch ein wichtiges Zytokin für die Initiierung einer T_H1-Immunantwort herunterreguliert, wodurch ebenfalls mögliche Entzündungsreaktionen supprimiert werden. Während also in unseren Versuchen EmMed und EmVes *in vitro* dosisabhängig die IL-12-Ausschüttung von PBMC hemmten (Hübner et al. 2006), konnten andere Autoren durch Behandlung mit IL-12 das Metacestodenwachstum in Mäusen verlangsamen (Emery et al. 1998). Möglicherweise kann der Metacestode also die IL-12-Produktion negativ beeinflussen um dadurch seinen weiteren Wachstum zu ermöglichen. Eine im Vergleich mit gesunden Blutspendern verminderte IL-12-Konzentration wurde auch in Seren von Patienten mit AE gefunden, wobei Patienten mit abortiven oder stabilen Infektionen die geringsten Konzentrationen an diesem Zytokin aufwiesen (Dreweck et al. 1999).

IFNγ

Im Gegensatz dazu war *in vitro* die IFNγ-Ausschüttung von PBMC nach Stimulation mit EmMed sowie EmVes signifikant erhöht. Dieser Effekt konnte nach Zugabe von LPS zu den mit EmMed und EmVes stimulierten PBMC nicht eindeutig reproduziert werden. Eine erhöhte Konzentration von IFNγ gab es sowohl in Seren von AE-Patienten (Shi et al. 2004), als auch in Zellkulturüberständen von deren PBMC, die mit EmMed oder *E. multilocularis* Vesikelinhalt stimuliert worden waren (Hübner et al. 2006). Die bereits erwähnte erfolgreiche Behandlung von *E. multilocularis*-infizierten Mäusen mit IL-12 war mit einer Zunahme der IFNγ-Produktion verbunden (Emery et al. 1998). Dennoch konnte durch eine direkte Behandlung von infizierten Mäusen, mit IFNγ keine wesentliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs erzielt werden (Liance et al. 1998). Dies war auch bei Patienten der AE der Fall (Jenne et al. 1998).

IL-1β

Der Einfluss von *Echinococcus*-Produkten auf die IL-1β-Produktion war in unseren Versuchen unterschiedlich zwischen EmMed und EmVes. Während EmMed die IL-1β-Produktion *in vitro* nicht beeinflusste, induzierte EmVes IL-1β. Allerdings wiesen PBMC von AE-Patienten geringere IL-1β-Konzentrationen auf als gesunde Blutspender (Eger et al. 2003).

IL-10

Bei Patienten mit AE ist die IL-10-Konzentration hoch und steigt bei progressivem Krankheitsverlauf weiter an (Wellinghausen et al. 1999, Godot et al. 1997). In unseren Versuchen konnte durch eine Co-Stimulierung von PBMC mit EmMed oder EmVes jedoch keine höhere IL-10-Produktion nachgewiesen werden, weder nach noch ohne LPS-Zugabe.

TGFβ

Auch TGFβ, welches ebenso wie IL-10 eine allgemeine herunterregulierende Wirkung auf das Immunsystem hat, wurde weder durch eine Co-Stimulierung mit EmMed noch mit EmVes vermehrt produziert.

Zusammengefasst regulierten somit EmMed und EmVes bei Co-Kultivierung mit LPS-stimulierten PBMC die T_H1-Zytokine TNFα und IL-12 herunter, dies aber war unabhängig von IL-10 oder TGFβ. Dabei handelt es sich nicht um einen artifiziellen Effekt etwa durch eine toxische Wirkung der *Echinococcus*-Substanzen, die zu einer verringerten Viabilität der Blutzellen geführt hätte. Nach der Restimulation der Zellen mit dem Mitogen Phytohämagglutinin stiegen die Zytokine TNFα, IFNγ und IL-10 gleichmäßig an. Zudem wurden nicht alle Zytokine durch die Co-Stimulierung von EmMed und EmVes verringert, sondern IFNγ wie auch IL-1β wurden verstärkt induziert, was ebenfalls gegen einen toxischen Effekt dieser Substanzen spricht.
EmMed zeigte *in vitro* ähnliche Eigenschaften wie EmVes. Während aber der immunmodulierende Effekt der *E. multilocularis*-Vesikel möglicherweise durch direkten Kontakt zwischen Immunzellen und Vesikeln vermittelt wurde, konnte der modulierende Einfluss des Metacestodenkulturüberstandes (EmMed) durch lösliche Komponenten induziert werden. Deshalb wurde für die Suche nach der aktiven Komponente EmMed verwendet.

4.2.3 Genexpressionsanalyse von LPS-stimulierten Zellen mit EmMed

Um weitere Aufschlüsse über die Auswirkungen von EmMed auf LPS-stimulierte PBMC zu bekommen, wurden von drei gesunden Blutspendern PBMC isoliert und *in vitro* mit LPS und EmMed kultiviert sowie mit Kontrollansätzen verglichen, bei denen die PBMC nur mit LPS stimuliert wurden. Diesmal wurde in allen Ansätzen die genomweite Genexpression der PBMC mittels DNA-Microarray-Analyse gemessen.

Die Co-Stimulation von PBMC mit LPS und EmMed führte dazu, dass 145 Gene differenziell reguliert waren. Davon waren 124 Gene hochreguliert, die zumeist mit Apoptose (11 Gene) und der Motilität von Zellen (14 Gene) assoziiert sind. Auch Gene, die aktivierende Eigenschaften auf die Reifung, Proliferation und Differenzierung von Immunzellen haben wurden durch EmMed in ihrer Expression gefördert.

Die Microarray-Analyse ergab, dass durch EmMed auch Gene, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind differenziell exprimiert wurden. So waren z.B. die Gene BAT1 und CD47 hochreguliert, die an einer anti-inflammatorischen Immunreaktion beteiligt sind. BAT1 (HLA-**B**-**a**ssociated **t**ranscript) gehört zur DEAD-box-Familie der RNA-bindenden Proteine. Dabei konnte gezeigt werden, dass Monozyten- und T-Zelllinien (Jurkat- und THP1-Zellen), bei denen die Expression von BAT1 durch Transfektion mit anti-sense-mRNA gehemmt worden

war, mehr TNFα, IL-1 und IL-6 produzierten als die entsprechenden Kontrollen. Dies lässt vermuten, dass BAT1 ein negativer Regulator der Entzündungsantwort ist (Allcock et al. 2001). Zudem ist BAT1, das in der Nähe von TNFα und TNFβ in der sog. HLAIII-Region des menschlichen MHC-Komplexes liegt, ein Kandidatengen für die Rheumatoide Arthritis (Ota et al. 2001).

Das zweite hochregulierte Gen war das Integrin-assoziierte Protein CD47, ein ubiquitäres integrales Membranprotein, welches die Eliminierung von Zellen durch Makrophagen hemmt (Oldenborg et al. 2000, Okazawa et al. 2005). In ko-Mäusen wurde gezeigt, dass CD47 auch daran beteiligt ist, polymorphkernige Leukozyten an den Ort der Entzündung zu locken (Lindberg et al. 1996). CD47, das stark auf T-Zellen exprimiert ist, interagiert mit dem **si**gnal-**r**egulator **p**rotein (SIRP)-alpha. Es ist ein negativer Regulator für humane T- und Dendritische Zellen, wobei die IL-12-vermittelte Reaktivität von $CD4^+$- und $CD8^+$-Zellen und die Aktivierung von Dendritischen Zellen vermindert werden (Latour et al. 2001).

Herunterreguliert durch die Co-Stimulation mit EmMed wurde das Gen für die proinflammatorische OASL (2´5´**O**ligo**a**denylat**s**ynthetase-**l**ike). Dieses Protein wird durch IFNγ induziert und ist mit der Autoimmunerkrankung **S**ystemischer **L**upus **E**rythematodes (SLE) assoziiert. Bei SLE-Patienten die zusätzlich noch bakterielle oder virale Infektionen aufwiesen, war die Expression des OASL-Gens negativ mit der Infektionsstärke korreliert (Ye et al. 2006). Es ist ebenfalls an der antiviralen Funktion von IFN beteiligt (Kakuta et al. 2002).

Proinflammatorisch wirken die durch Co-Stimulierung mit EmMed hochregulierten Gene CD58, NFATC3, HSP70 und MARCO.

CD58, das **l**ymphocyte **f**unction-**a**ssociated antigen (LFA), ist der Ligand für CD2, das die Adhäsion zwischen humanen T-Lymphozyten und Zielzellen vermittelt (Liu et al. 2005). Die Interaktion von CD2 und CD58 steigert die Adhäsion im TCR-MHC-Komplex, wodurch das primäre Signal amplifiziert und die T-Zell-Antigen-Interaktion verstärkt wird (Wang et al. 2000, Liu et al. 2005). Eine Inhibierung der Interaktion von CD2 und CD58 kann dabei immunsuppressiv wirken (Bachmann et al. 1999). Hohe Werte von CD58 waren bei Patienten mit Hepatitis B mit der Schwere des Krankheitsverlaufs positiv korreliert (Sheng et al. 2006).

Alefacept, ein rekombinantes LFA-3-IgG1-Fusionsprotein inhibiert die Interaktion von CD2 auf T-Zellen mit CD58 auf Antigenpräsentierenden Zellen und reduziert die Anzahl von Gedächtnis-Effektor-Lymphozyten im peripheren Blut (Ormerod 2003). Alefacept wird als Medikament gegen Psoriasis, einer Hauterkrankung mit überstürzter Epidermisbildung, verwendet (Ormerod 2003).

NFATC3 (**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T**-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent **C3**) ist ein Mitglied der NFAT-Familie von Transkriptionsfaktoren die Regulatoren der Genexpression im Immunsystem sind. Die Aktivierung von NFAT findet über Calcineurin statt. In NFATC2/NFATC3-Doppelknockout-Mäusen differenzieren sich naive T_H-Vorläuferzellen zu T_H2-Zellen und können ohne eine Beteiligung von CD28 aktiviert werden (Rengarajan et al. 2002). Dabei waren diese Zellen bei einer T-Zellrezeptor-Aktivierung hyperreaktiv (Rengarajan et al. 2002).

Das Hitzeschockprotein HSP70 verstärkt die Aktivierung von NFκB, reguliert den TLR4 herunter und induziert in Monozyten die Produktion von TNFα (Chen et al. 2004). Die Eigenschaft des HSP70, bestimmte Peptide zu binden, wird genutzt um Vakzinierungen gegen Krebs oder Infektionskrankheiten zu erzielen (Udono & Srivastava 1993, Flechtner et al. 2006).

Der Makrophagenrezeptor mit kollagener Struktur (MARCO) ist ein Typ II Transmembranprotein der Klasse A-Scavenger-Rezeptorfamilie. MARCO bindet sowohl hitzeinaktivierte als auch lebende Bakterien, wobei LPS der entsprechende Ligand ist (Gough & Gordon 2000). MARCO kann auf Makrophagenpopulationen, Dendritischen Zellen und Mikrogliazellen exprimiert sein. Nach bakteriellen Infektionen kann MARCO in Makrophagen hochreguliert werden, und Dendritische Zellen exprimieren MARCO nach der Phagozytose von apoptotischen Zellen (Kraal et al. 2000, Grolleau et al. 2003).

Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien sowie die Zytokinmessungen belegen die modulierenden Effekte in Immunzellen, die durch EmMed hervorgerufen werden. Diese entspricht der von uns beobachteten gemischten T_H1/T_H2-Immunantwort in AE-Patienten (Hübner et al. 2006), aber auch der Zytokinproduktion von normalen PBMC bei der Co-Kultivierung mit EmMed. Dass der von EmMed vermittelte Effekt auf eine toxische Reaktion zurückzuführen ist, ist unwahrscheinlich, da erstens in der Microarray-Analyse eine stärkere Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen und eines damit verbundenen Gennetzwerks hätte auftreten müssen, und zweitens die Zellen nach 96-stündiger Inkubation nach PHA-Restimulation teilweise erhöhte Zytokinkonzentrationen ausschütteten.

4.2.4 Aktive Komponente im EmMed

Um Inhibitoren der proinflammatorischen Zytokinsynthese detektieren zu können, wurden die PBMC im Beisein von EmMed mit LPS stimuliert und anschließend die Kapazität der Substanzen, die gemessenen Zytokine im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen ohne EmMed zu hemmen, ermittelt.

Da in den vorherigen Experimenten EmMed sowohl IL-12 als auch TNFα gehemmt hatten, wurden diese beiden Zytokine für die Suche nach der aktiven Komponente im EmMed verwendet. Dabei wäre es sinnvoll gewesen, möglichst einfache, biochemisch gut definierte Medien für die *in vitro*-Kultur des Metacestodengewebes zu verwenden. Proteinhaltige Beimischungen wären dabei eher störend für eine rasche Identifizierung parasitenabgeleiteter Substanzen. Allerdings schlugen alle Versuche, den Metacestoden in serumfreien oder aber chemisch definierten Medien zu kultivieren, fehl, da die Metacestoden für ihr Wachstum Serumfaktoren benötigen. In unseren Versuchen wurde dazu fötales Rinderserum in 10-prozentiger Konzentration eingesetzt. Die Proteinmenge in dem verwendeten Zellkulturmedium war dabei so groß, dass Methoden wie etwa die zweidimensionale Gelelektrophorese für das Screening der modulierenden Substanzen von vornherein ausgeschlossen waren.

Somit war das Mittel der Wahl die Chromatographie. Erste Ergebnisse erbrachte die Fraktionierung mittels der PD-10-Säule, die normalerweise für eine Entsalzung von Proteingemischen verwendet wird. Da bei der PD-10-Säule zunächst die Salze, dann die hochmolekularen und zuletzt die niedermolekularen Proteine eluiert werden, muss die aktive Komponente, die bei den angeführten Versuchen erst ab der neunten Elution kam, niedermolekular gewesen sein.

Eine feinere Auftrennung wurde anhand der HPLC durchgeführt. Für diese Technik musste der EmMed tiefgefroren und lyophilisiert werden. Beide Vorgänge konnten durchgeführt werden, ohne dass EmMed die Eigenschaft verlor, die LPS-induzierten Zytokine TNFα und IL-12 zu hemmen. Da beim Gefriertrocknen die Hydrathülle verloren geht und zudem die Hitzeinaktivierung des EmMed sowie das saure Milieu der HPLC keinen Einfluss auf dessen Aktivität hatten, scheint die aktive Komponente peptidartig zu sein.

Der im HPLC-Lauf detektierte 18,6-Minuten-Peak trat nur im EmMed, nicht aber im Kontrollmedium auf. Die entsprechende Fraktion im EmMed hemmte bei allen getesteten Blutspendern die IL-12- und TNFα-Produktion, wobei jedoch auch dieselbe Fraktion im Kontrollmedium bei drei von vier Blutspendern die IL-12- und TNFα-Konzentration verringerte.

Die Identifizierung der aktiven Komponente mittels LC/ESI-MS und Edman-Abbau ergab, dass in der aktiven 18,6-Minuten-Fraktion des EmMed zwei Peptide mit einem Molekülgewicht von 1019 und 1915 Da vorhanden sind.

Für das Peptid mit dem Molekülgewicht von 1915 Da konnte die Aminosäuresequenz ermittelt werden, die es als Fibrinopeptid B identifizierte. Fibrinopeptid B ist ein Bestandteil der β-Kette des Fibrinogen und stammt somit aus dem FBS des Zellmediums. Allerdings trat am Fibrinopeptid B eine Modifikation durch ein Sulfotyrosin auf. Inwiefern diese Modifikation allerdings einen Einfluss auf dessen Funktion hat ist ungeklärt.

Ein synthetisch hergestelltes Peptid mit der gleichen Aminosäuresequenz wie Fibrinopeptid B, dem allerdings die Modifikation fehlte, konnte dosisabhängig die IL-12- und TNFα-Konzentration hemmen. Injektionen von Fibrinopeptid B im Tiermodell zeigten schon früher, dass Fibrinopeptid B als Immunmodulator wirkt. Durch Injektionen von Fibrinopeptid A oder B konnte der Verlauf einer experimentellen allergischen Enzephalomyelitis signifikant verbessert werden (Scherer et al. 1980), und durch Carrageenin ausgelöste Ödeme wurden in Ratten durch Fibrinopeptid reduziert (Ruhenstroth-Bauer et al. 1981). Thrombin vermittelt die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin, indem es Fibrinopeptid A und B von der α- und β-Kette abspaltet.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte das zweite Peptid mit einem Molekülgewicht von 1019 Da nicht identifiziert werden. Dabei konnte auch eine vorherige Acetylierung deren Identifikation nicht erleichtern. Vermutlich war das Peptid N-terminal blockiert, wodurch der Edman-Abbau nicht durchgeführt werden konnte, oder die Peptidmenge war zu gering. Bei einer zweiten Analyse soll nun versucht werden, das Peptid zu ermitteln.

Da der Peak des Peptids mit dem Molekülgewicht von 1019 Da in der HPLC deutlich höher war als der des zweiten Peptids, wird vermutet, dass dieses Metacestoden-spezifisch ist und nicht abundant im Medium vorkommt. Um aber zu klären, ob dieses die gesuchte aktive Komponente ist, muss abgewartet werden, bis die Aminosäuresequenz bekannt ist und das synthetisierte Peptid auf seine hemmende Eigenschaft untersucht werden kann.

4.3 Ausblick

Adultwürmer von *L. sigmodontis* konnten den Verlauf einer LPS-ausgelösten Sepsis günstig aber auch letal gestalten, während Mikrofilarien durchweg die darauffolgende LPS-Behandlung letal verlaufen ließen. Diese inflammatorische Reaktion war mit einer überschießenden Produktion von IFNγ assoziiert. In zukünftigen Versuchen sollte ermittelt werden, ob die erhöhte IFNγ-Produktion zu einer Sensitivierung der Monozyten führte und ob deshalb die folgende LPS-Injektion letal verlief. Ein Transfer von Monozyten aus Mikrofilarien-infizierten Mäusen in naive Mäuse, die anschließend LPS-injiziert bekommen, sollte dies klären.

Zusätzlich sollten die Populationen an Immunzellen bei den Mäusen mit implantierten weiblichen Filarien aus präpatenten Infektionen genauer untersucht werden, um festzustellen, welche den günstigeren Verlauf der LPS-induzierten Sepsis vermitteln. Dazu müssten neben den Veränderungen im peripheren Blut auch die Verhältnisse in der Nähe der implantierten Filarien z. B. anhand der Peritoneal-Exudatzellen untersucht werden

Die von Filarienweibchen aus präpatenten Infektionen induzierte Modulation der Immunantwort des Wirtes sollte ebenfalls daraufhin untersucht werden, ob eine spätere Mikrofilarieninfektion die LPS-induzierte Sepsis verstärkt oder abschwächt. Filarienweibchen, die nach einer natürlichen Infektion heranwachsen, modulieren jedenfalls zuerst die Immunantwort der Wirte, bevor sie die T_H1-induzierenden Mikrofilarien freisetzen. Ob dabei induzierte regulatorische T-Zellen auch die experimentell ausgelösten Sepsissymptome mindern, könnte durch einen Transfer solcher Zellen auf naive oder auch Mikrofilarien-infizierte Tiere untersucht werden.

Die positiven modulierenden Auswirkungen einer Infektion mit *E. multilocularis*-Metacestoden könnte in Zwischenwirten wie den Wüstenrennmäusen, in denen sich der Metacestode besser entwickelt als in Labormäusen, untersucht werden. Dies setzte allerdings voraus, dass wichtige Immunparameter quantitativ gemessen werden können. Dafür müssten neue Ansätze etabliert werden.

Die bisher gefundenen anti-inflammatorischen Substanzen aus Helminthen, insbesondere das - neben dem bereits identifizierten Fibrinopeptid B - zweite parasitenabgeleitete 1019 Da-Peptid sollten genauer charakterisiert werden. Dazu könnten umfangreiche Analysen der Genexpression beitragen.

Vor allen Dingen sollten diese anti-inflammatorischen Substanzen *in vivo* ausführlich getestet werden. Dafür kämen verschiedene Applikationsformen etwa über implantierte osmotische Minipumpen in Frage. Neben ihrer Rolle bei der Behandlung einer experimentell ausgelösten Sepsis könnten die gefundenen Peptide auch auf ihre immunmodulatorischen Eigenschaften in Infektionsmodellen mit Sepsis-auslösenden bakteriellen Erregern geprüft werden. Schließlich könnte noch deren Rolle in Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn, Multiple Sklerosis oder Rheumatoide Arthritis genauer untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit Helminthen führen oft zu chronischen Erkrankungen, die durch eine generalisierte Immunsuppression und ein unauffälliges Krankheitsbild gekennzeichnet sind.
Helminthen modulieren dabei aktiv durch sekretorische/exkretorische Substanzen das Immunsystem ihrer Wirte, wodurch nicht nur entzündliche Abwehrreaktionen des Wirtes supprimiert, sondern gleichzeitig die Persistenz des Parasiten in den Wirten erleichtert wird.
In den letzten Jahren wurde dieses Potential der Helminthen, modulierend in das Immunsystem ihrer Wirte einzugreifen, näher untersucht und es konnte sowohl bei Autoimmunerkrankungen des Menschen als auch in Allergiemodellen der Krankheitsverlauf durch Helminthen oder deren sekretorische/exkretorische Produkte günstig beeinflusst werden.
In vorliegender tierexperimenteller Arbeit wurden der Nematode *Litomosoides sigmodontis*, eine Nagetierfilarie, sowie der Cestode *Echinococcus multilocularis*, der Fuchsbandwurm, verwendet, um eine Lipopolysaccharid (LPS)-ausgelöste Entzündungsreaktion zu mildern.
Hierfür wurden Mäuse mit verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis* oder dem Metacestodenstadium von *E. multilocularis* infiziert und nach einiger Zeit eine Sepsis experimentell ausgelöst. Außerdem wurden die sekretorischen/exkretorischen Produkte von *E. multilocularis* auf ihre immunmodulatorischen Eigenschaften *in vitro* getestet, wodurch anti-inflammatorisch wirksame Komponenten identifiziert werden sollten. Dabei wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) von Blutspendern mit LPS stimuliert und daraufhin untersucht, ob durch die Metacestodenprodukte, die Produktion der T_H1-Zytokine IL-12 und TNFα gehemmt wird.
Bei den Experimenten mit *L. sigmodontis* wurden die Mäuse auf unterschiedliche Weise mit den einzelnen Parasitenstadien konfrontiert. Mit Mikrofilarien infizierte Mäuse zeigten bei der Gabe einer subletalen Dosis von LPS einen letalen Verlauf, der durch eine drastische Erhöhung von T_H1-Zytokinen und proinflammatorischen Chemokinen, einer Zunahme der Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut und einer starken Temperaturabnahme gekennzeichnet war. Die Implantation von Filarienweibchen aus patenten Infektionen resultierte nach subletaler LPS-Gabe in einem letalen Infektionsverlauf, wie er auch schon bei den Mikrofilarien-infizierten Mäusen beobachtet wurde. Dieser letale Verlauf resultierte vermutlich daraus, dass das Immunsystem nicht, wie bei natürlichen Infektionen, durch die adulten Filarienweibchen vor der Mikrofilarienfreisetzung moduliert werden konnte. Bei Implantation von adulten *L. sigmodontis*-Weibchen aus postpatenten oder präpatenten Infektionen, bei denen keine Mikrofilarien im peripheren Blut der Mäuse nachweisbar waren, veränderten sich hingegen die Konzentrationen der T_H1-Zytokine nicht oder wurden bei Filarien aus präpatenten Infektionen

sogar deutlich vermindert im Vergleich zu den LPS-behandelten scheininfizierten Kontrollen. Alle Tiere mit Filarien aus präpatenten oder postpatenten Infektionen überlebten die LPS-Injektion.

Die Verwendung von MARCO-ko-, IFNγR-ko- und TNFR1-ko-Mäusen zeigte, dass die letalen Infektionsverläufe nach Mikrofilarieninfektion und LPS-Gabe im Wesentlichen durch Makrophagen, IFNγ und TNFα, die die Inflammationskaskade einleiten, vermittelt wurden. Mikrofilarien im peripheren Blut der Empfängertiere induzierten das T_H1-typische Zytokin IFNγ, unabhängig davon ob adulte Filarien in den Versuchstieren vorhanden waren. Das IFNγ aktiviert Monozyten, NK-Zellen und neutrophile Granulozyten, die allein durch die Mikrofilarieninfektion vermehrt im peripheren Blut vorhanden waren. Zudem kann die IFNγ-Induktion die Expression des TLR4 (sowie MD-2 und MyD88) auf Monozyten hochregulieren, wodurch diese auf die nachfolgende LPS-Injektion verstärkt reagieren.

Die einzelnen Stadien von *L. sigmodontis* können demnach eine LPS-induzierte Sepsis sowohl günstig als auch letal verlaufen lassen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit, konnte gezeigt werden, dass *E. multilocularis*-infizierte Mäuse im Sepsisversuch eine vermutlich durch IL-10-vermittelte Suppression der T_H1-vermittelten Entzündungsreaktion hatten, die sich jedoch nicht eindeutig in der Überlebensrate widerspiegelte.

Der Metacestodenkulturüberstand mit und ohne Vesikel hemmte *in vitro* die Ausschüttung der T_H1-Zytokine IL-12 und TNFα von LPS-stimulierten PBMC. Genexpressionsanalysen zeigten dabei, dass der vesikelfreie Überstand Gene beeinflusst, die an der Apoptose, Zellbewegung, -reifung, -proliferation und –differenzierung beteiligt sind. Außerdem konnten mit BAT1 und CD47 zwei Gene identifiziert werden, die als negative Regulatoren der Entzündungsreaktion gelten.

Durch die Fraktionierung des vesikelfreien Überstandes mittels HPLC konnte eine Fraktion ermittelt werden, die sowohl die IL-12- als auch die TNFα-Ausschüttung der LPS-stimulierten PBMC hemmte. Diese Fraktion enthielt zwei Peptide (1019 und 1915 Da), wovon eines als am Tyrosin modifiziertes Fibrinopeptid B (1915 Da) identifiziert wurde. Ein synthetisch hergestelltes Peptid mit gleicher Sequenz wie das Fibrinopeptid B, dem jedoch die Modifikation am Tyrosinrest fehlte, hemmte dosisabhängig die LPS-induzierte TNFα- und IL-12-Freisetzung. Diese Ergebnisse zeigen, dass sekretorische/exkretorische Produkte von Helminthen die Fähigkeit haben entzündliche Immunreaktionen zu hemmen. Dadurch verbessern Parasiten nicht nur ihre Überlebenschancen in ihren Wirten sondern vermindern gleichzeitig die Krankheitssymptome bei einer Infektion.

6 Literaturverzeichnis

Abdi K. IL-12: The role of p40 versus p75. Scand J Immunol 2002; **56**: 1-11.

Al-Qaoud KM, Pearlman E, Hartung T, Klukowski J, Fleischer B, Hoerauf A. A new mechanism for IL-5-dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. Int Immunol 2000; **12**: 899-908.

Allcock RJ, Williams JH, Price P. The central MHC gene, BAT1, may encode a protein that down-regulates cytokine production. Genes Cells 2001; **6**: 487-494.

Amiot F, Vuong P, Defontaines M, Pater C, Dautry F, Liance M. Secondary alveolar echinococcosis in lymphotoxin-alpha and tumour necrosis factor-alpha deficient mice: exacerbation of *Echinococcus multilocularis* larval growth is associated with cellular changes in the periparasitic granuloma. Parasite Immunol 1999; **21**: 475-483.

Aumüller E, Schramm G, Gronow A, Brehm K, Gibbs BF, Doenhoff MJ, Haas H. *Echinococcus multilocularis* metacestode extract triggers human basophils to release interleukin-4. Parasite Immunol 2004; **26**: 387-395.

Bachmann MF, Barner M, Kopf M. CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. J Exp Med 1999; **190**: 1383-1392.

Bain O, Wanji S, Vuong PN, Marechal P, Le Goff L, Petit G. Larval biology of six filariae of the sub-family Onchocercinae in a vertebrate host. Parasite 1994; **1**: 241-254.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; **98**: 9237-9242.

Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. J Immunol 2006; **176**: 5374-5387.

Beall MJ, McGonigle S, Pearce EJ. Functional conservation of *Schistosoma mansoni* Smads in TGF-beta signaling. Mol Biochem Parasitol 2000; **111**: 131-142.

Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schulte R, Autenrieth IB. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. Infect Immun 1998; **66**: 2213-2220.

Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol 2003; **111**: S460-475.

Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. Blood 2002; **99**: 3427-3431.

Brattig NW, Bazzocchi C, Kirschning CJ, Reiling N, Buttner DW, Ceciliani F, Geisinger F, Hochrein H, Ernst M, Wagner H, Bandi C, Hoerauf A. The major surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. J Immunol 2004; **173**: 437-445.

Brattig NW, Rathjens U, Ernst M, Geisinger F, Renz A, Tischendorf FW. Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. Microbes Infect 2000; **2**: 1147-1157.

Brattig NW, Tischendorf FW, Albiez EJ, Buttner DW, Berger J. Distribution pattern of peripheral lymphocyte subsets in localized and generalized form of onchocerciasis. Clin Immunol Immunopathol 1987; 44: 149-159.

Bresson-Hadni S, Laplante JJ, Lenys D *et al.* Seroepidemiologic screening of *Echinococcus multilocularis* infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg 1994 A; **51**: 837-846.

Bresson-Hadni S, Petitjean O, Monnot-Jacquard B, Heyd B, Kantelip B, Deschaseaux M, Racadot E, Vuitton DA. Cellular localisations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha mRNA in a parasitic granulomatous disease of the liver, alveolar echinococcosis. Eur Cytokine Netw 1994 B; **5**: 461-468.

Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Lenys D, Liance M, Racadot E, Miguet JP. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989; **78**: 61-66.

Chandrashekar R, Rao UR, Rajasekariah GR, Subrahmanyam D. Separation of viable microfilariae free of blood cells on Percoll gradients. J Helminthol 1984; **58**: 69-70.

Chen CC, Louie S, McCormick B, Walker WA, Shi HN. Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric *Citrobacter rodentium* and enhances *Citrobacter*-induced colitis in mice. Infect Immun 2005; **73**: 5468-5481.

Chen X, Sun Z, Du X, Liu C, Liu Y, Wu L. Study on the relationship between heat shock protein 70 and toll-like receptor-4 of monocytes. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2004; **24**: 560-562.

Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med 1990; **172**: 1535-1545.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002; **420**: 885-891.

Colwell DA, Wescott RB. Prolongation of egg production of *Nippostrongylus brasiliensis* in mice concurrently infected with *Nematospiroides dubius.* J Parasitol 1973; **59**: 216.

Cross HF, Haarbrink M, Egerton G, Yazdanbakhsh M, Taylor MJ. Severe reactions to filarial chemotherapy and release of *Wolbachia* endosymbionts into blood. Lancet 2001; **358**: 1873-1875.

De Waal Malefyt R, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. Curr Opin Immunol 1992; **4**: 314-320.

DeFranco AL, Locksley RM, Robertson M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. New science press Ltd 2006; in press.

Dixon JB. Echinococcosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1997; **20**:87-94.

Doetze A, Satoguina J, Burchard G, Rau T, Loliger C, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. Int Immunol 2000; **12**: 623-630.

Dreweck CM, Soboslay PT, Schulz-Key H, Gottstein B, Kern P. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. Parasite Immunol 1999; **21**: 433-438.

Eckert J, Conraths FJ, Tackmann K. Echinococcosis: an emerging or re-emerging zoonosis? Int J Parasitol 2000; **30**: 1283-1294.

Eger A, Kirch A, Manfras B, Kern P, Schulz-Key H, Soboslay PT. Pro-inflammatory (IL-1β, IL-18) cytokines and IL-8 chemokine release by PBMC in response to *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. Parasite Immunol 2003; **25**: 103-5.

Elsbach P, Weiss J. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide. Immunobiology 1993; **187**: 417-429.

Emery I, Leclerc C, Sengphommachanh K, Vuitton DA, Liance M. *In vivo* treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. Parasite Immunol 1998; **20**: 81-91.

Emery I, Liance M, Deriaud E, Vuitton DA, Houin R, Leclerc C. Characterization of T-cell immune responses of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6J mice. Parasite Immunol 1996; **18**: 463-472.

Falcone FH, Loke P, Zang X, MacDonald AS, Maizels RM, Allen JE. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. J Immunol 2001; **167**: 5348-5354.

Farber JM. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. J Leukoc Biol 1997; **61**: 246-257.

Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. Front Biosci 1997; **2**: d12-26.

Flechtner JB, Cohane KP, Mehta S, Slusarewicz P, Leonard AK, Barber BH, Levey DL, Andjelic S. High-Affinity Interactions between Peptides and Heat Shock Protein 70 Augment CD8+ T Lymphocyte Immune Responses. J Immunol 2006; **177**: 1017-1027.

Freudenberg MA, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. Int Rev Immunol 1990; **6**: 207-221.

Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, Cavaillon JM, Philpott DJ, Adib-Conquy M. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. Eur J Immunol 2005; **35**: 2459-2470.

Fulkerson PC, Zhu H, Williams DA, Zimmermann N, Rothenberg ME. CXCL9 inhibits eosinophil responses by a CCR3- and Rac2-dependent mechanism. Blood 2005; **106**: 436-443.

Gillette-Ferguson I, Hise AG, McGarry HF, Turner J, Esposito A, Sun Y, Diaconu E, Taylor MJ, Pearlman E. *Wolbachia*-induced neutrophil activation in a mouse model of ocular onchocerciasis (river blindness). Infect Immun 2004; **72**: 5687-5692.

Godot V, Harraga S, Beurton I *et al.* Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. Clin Exp Immunol 2000; **121**: 484-490.

Godot V, Harraga S, Deschaseaux M, Bresson-Hadni S, Gottstein B, Emilie D, Vuitton DA. Increased basal production of interleukin-10 by peripheral blood mononuclear cells in human alveolar echinococcosis. Eur Cytokine Netw 1997; **8**: 401-408.

Gomez-Escobar N, Gregory WF, Maizels RM. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. Infect Immun 2000; **68**: 6402-6410.

Goodridge HS, Wilson EH, Harnett W, Campbell CC, Harnett MM, Liew FY. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*. J Immunol 2001; **167**: 940-945.

Gottstein B, Felleisen R. Protective immune mechanisms against the metacestode of *Echinococcus multilocularis*. Parasit Today 1995; **11:** 320-326.

Gottstein B, Hemphill A. Immunopathology of echinococcosis. Chem Immunol 1997; **66**: 177-208.

Gottstein B, Saucy F, Deplazes P, Reichen J, Demierre G, Busato A, Zuercher C, Pugin P. Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? Emerg Infect Dis 2001; **7**: 408-412.

Gottstein B. Epidemiologie und Systematik der cystischen und alveolären Echinokokkose. Chirurg 2000; **71**: 1-8.

Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. Clin Microbiol Rev 1992: **5**: 248-261.

Gough PJ, Gordon S. The role of scavenger receptors in the innate immune system. Microbes Infect 2000; **2**: 305-311.

Graham AL, Lamb TJ, Read AF, Allen JE. Malaria-filaria coinfection in mice makes malarial disease more severe unless filarial infection achieves patency. J Infect Dis 2005; **191**: 410-421.

Greene BM, Fanning MM, Ellner JJ. Nonspecific suppression of antigen-induced lymphocyte blastogenesis in *Onchocerca volvulus* infection in man. Clin Exp Immunol 1983; **52**: 259-265.

Grolleau A, Misek DE, Kuick R, Hanash S, Mule JJ. Inducible expression of macrophage receptor Marco by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays. J Immunol 2003; **171**: 2879-2888.

Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, McGuirk P, van Eden W, Versalovic J, Weinstock JV, Rook GA. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 2006; **3**: 275-284.

Harraga S, Godot V, Bresson-Hadni S, Mantion G, Vuitton DA. Profile of cytokine production within the periparasitic granuloma in human alveolar echinococcosis. Acta Trop 2003; **85**: 231-236.

Hartmann S, Kyewski B, Sonnenburg B, Lucius R. A filarial cysteine protease inhibitor down-regulates T cell proliferation and enhances interleukin-10 production. Eur J Immunol 1997; **27**: 2253-2260.

Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. Int J Parasitol 2003; **33**: 1291-1302.

Hawking F, Sewell P. The maintenance of a filarial infection (*Litomosoides carinii*) for chemotherapeutic investigations. Br J Pharmac Chemother 1948; **3**: 285.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. J Immunol 2004; **172**: 3157-3166.

Hille S. Filariosemodell *Litomosoides sigmodontis* in der Labormaus: Einfluss adulter Filarienmännchen auf die Immunantwort gegen Mikrofilarien. Diplomarbeit, Tübingen 2003.

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

Hoerauf A, Satoguina J, Saeftel M, Specht S. Immunomodulation by filarial nematodes. Parasite Immunol 2005; **27**: 417-429.

Hoffmann W, Petit G, Schulz-Key H, Taylor D, Bain O, Le Goff L. *Litomosoides sigmodontis* in mice: reappraisal of an old model for filarial research. Parasitol Today 2000; **16**: 387-389.

Hoffmann WH. Gene expression of resistant and permissive mouse strains following infection with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*. www.tuebingenome.de/subproject/sp3/sp3b/html 2001 B.

Hoffmann WH, Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT. Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmodontis* filariasis.Parasitology. 2001 A; **122**: 641-649. Erratum in: Parasitology 2001 Sep;123(Pt 3):234. Soboslav PT [corrected to Soboslay PT].

Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin 10. Immunol Today 1992; **13**: 198-200.

Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 1993; **259**: 1742-1745.

Hübner MP, Manfras BJ, Margos MC, Eiffler D, Hoffmann WH, Schulz-Key H, Kern P, Soboslay PT. *Echinococcus multilocularis* metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients. Clin Exp Immun 2006; **145**: 243-251.

Ingold K, Bigler P, Thormann W, Cavaliero T, Gottstein B, Hemphill A. Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against *In vitro*-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. Antimicrob Agents Chemother 1999; **43**: 1052-1061.

Jenne L, Kilwinski J, Radloff P, Flick W, Kern P. Clinical efficacy of and immunologic alterations caused by interferon gamma therapy for alveolar echinococcosis. Clin Infect Dis 1998; **26**: 492-494.

Jenson JS, O'Connor R, Osborne J, Devaney E. Infection with *Brugia* microfilariae induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. Eur J Immunol 2002; **32**: 858-867.

Jiang Y, Beller DI, Frendl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. J Immunol 1992; **148**: 2423-2428.

Kakuta S, Shibata S, Iwakura Y. Genomic structure of the mouse 2',5'-oligoadenylate synthetase gene family. J Interferon Cytokine Res 2002; **22**: 981-993.

Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, Hunter CA, Pearce EJ. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. J Immunol 2004; **173**: 7454-7461.

Kern P, Wechsler JG, Lauchert W, Kunz R. Klinik und Therapie der alveolären Echinokokkose. Deutsches Ärzteblatt 1994; **91**: 343-349.

Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. Infect Immun 2002; **70**: 5931-5937.

Kilwinski J, Jenne L, Jellen-Ritter A, Radloff P, Flick W, Kern P. T lymphocyte cytokine profile at a single cell level in alveolar echinococcosis. Cytokine 1998; **11**: 373-381.

King CL, Mahanty S, Kumaraswami V, Abrams JS, Regunathan J, Jayaraman K, Ottesen EA, Nutman TB. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. J Clin Invest 1993; **92**: 1667-1673.

Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. J Endotoxin Res 2005; **11**: 225-229.

Kizaki T, Ishige M, Bingyan W, Day NK, Good RA, Onoe K. Generation of CD8+ suppressor T cells by protoscoleces of *Echinococcus multilocularis in vitro*. Immunology 1993; **79**: 412-417.

Koerten S, Volkmann L, Saeftel M, Fischer K, Taniguchi M, Fleischer B, Hoerauf A. Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. J Immunol 2002; **168**: 5199-5206.

Koerten S, Wildenburg G, Darge K, Büttner DW. Mast cells in onchocercomas from patients with hyperreactive onchocerciasis (sowda). Acta Trop 1998; **70**: 217-231.

Kraal G, van der Laan LJ, Elomaa O, Tryggvason K. The macrophage receptor MARCO. Microbes Infect 2000; **2**: 313-316.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 1993; **75**: 263-274.

La Flamme AC, Scott P, Pearce EJ. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. Parasite Immunol 2002; **24**: 339-345.

Lamb TJ, Graham AL, Le Goff L, Allen JE. Co-infected C57BL/6 mice mount appropriately polarized and compartmentalized cytokine responses to *Litomosoides sigmodontis* and *Leishmania major* but disease progression is altered. Parasite Immunol 2005; **27**: 317-324.

Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, Maliszewski C, Lindberg FP, Oldenborg A, Ullrich A, Delespesse G, Sarfati M. Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation. J Immunol 2001; **167**: 2547-2554.

Laufer S, Greim C, Bertsche T. An *in-vitro* screening assay for the detection of inhibitors of proinflammatory cytokine synthesis: a useful tool for the development of new antiarthritic and disease modifying drugs. Osteoarthritis Cartilage 2002; **10**: 961-967.

Lawrence RA, Allen JE, Osborne J, Maizels RM. Adult and microfilarial stages of the filarial parasite *Brugia malayi* stimulate contrasting cytokine and Ig isotype responses in BALB/c mice. J Immunol 1994; **153**: 1216-1224.

Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T. Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to *Salmonella enterica serovar typhimurium* infection despite attenuated cytokine response. Infect Immun 2001; **69**: 463-471.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 1989; **246**: 1306-1309.

Liance M, Ricard-Blum S, Emery I, Houin R, Vuitton DA. *Echinococcus multilocularis* infection in mice: *in vivo* treatment with a low dose of IFN-gamma decreases metacestode growth and liver fibrogenesis. Parasite 1998; **5**: 231-237.

Liance M, Vuitton DA, Guerret-Stocker S, Carbillet JP, Grimaud JA, Houin R. Experimental alveolar echinococcosis. Suitability of a murine model of intrahepatic infection by *Echinococcus multilocularis* for immunological studies. Experientia 1984; **40**: 1436-1439.

Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. J Exp Med 1995; **182**: 1301-1314.

Lindberg FP, Bullard DC, Caver TE, Gresham HD, Beaudet AL, Brown EJ. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. Science 1996; **274**: 795-798.

Lira SA, Zalamea P, Heinrich JN, Fuentes ME, Carrasco D, Lewin AC, Barton DS, Durham S, Bravo R. Expression of the chemokine N51/KC in the thymus and epidermis of transgenic mice results in marked infiltration of a single class of inflammatory cells. J Exp Med 1994; **180**: 2039-2048.

Liu J, Ying J, Chow VT, Hruby VJ, Satyanarayanajois SD. Structure-activity studies of peptides from the "hot-spot" region of human CD2 protein: development of peptides for immunomodulation. J Med Chem 2005; **48**: 6236-6249.

Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M, Allen JE. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive *in vivo* gene expression phenotype. BMC Immunol 2002; **3**: 7.

Maghazachi AA, Al-Aoukaty A, Schall TJ. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. Eur J Immunol 1996; **26**: 315-319.

Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites-masters of regulation. Immunol Rev 2004; **201**: 89-116.

Maizels RM, Lawrence RA. Immunological tolerance: The key feature in human filariasis? Parasitol Today 1991; **7**: 271-276.

Majcherczyk PA, Langen H, Heumann D, Fountoulakis M, Glauser MP, Moreillon P. Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. J Biol Chem 1999; **274**: 12537-12543.

Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinni MP, Maggi E, Trinchieri G, Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. J Exp Med 1993; **177**: 1199-1204.

Manfras BJ, Reuter S, Wendland T, Boehm BO, Kern P. Impeded T_h1 CD4 memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with *Echinococcus multilocularis*. Int Immunol 2004; **16**: 43-50.

Manoury B, Gregory WF, Maizels RM, Watts C. Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. Curr Biol. 2001; **11**: 447-451.

Marechal P, Le Goff L, Hoffman W, Rapp J, Oswald IP, Ombrouck C, Taylor DW, Bain O, Petit G. Immune response to the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and resistant mice. Parasite Immunol 1997; **19**: 273-279.

McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. J Immunol 2003; **171**: 2127-2133.

McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. J Immunol 2004; **173**: 1224-1231.

Meisner M. Biomarkers of sepsis: clinically useful? Curr Opin Crit Care 2005; 11: 473-80.

Mengozzi M, Ghezzi P. Cytokine down-regulation in endotoxin tolerance. Eur Cytokine Netw 1993; **4**: 89-98.

Mitchell AJ, Hansen AM, Hee L, Ball HJ, Potter SM, Walker JC, Hunt NH. Early cytokine production is associated with protection from murine cerebral malaria. Infect Immun 2005; **73**: 5645-5653.

Morath S, Geyer A, Hartung T. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. J Exp Med 2001; **193**: 393-397.

Mossinger J, Wenk P. Fecundity of *Litomosoides carinii* (Nematoda, Filarioidea) *in vivo* and *in vitro*. Z Parasitenkd 1986; **72**: 121-131.

Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Krudsood S, Treeprasertsuk S, Mazier D, Vouldoukis I, Looareesuwan S. *Ascaris lumbricoides* infection is associated with protection from cerebral malaria. Parasite Immunol 2000; **22**: 107-113.

Nakaya K, Nakao M, Ito A. *Echinococcus multilocularis*: mouse strain difference in hydatid development. J Helminthol. 1997; 71: 53-56.

Narumi S, Wyner LM, Stoler MH, Tannenbaum CS, Hamilton TA. Tissue-specific expression of murine IP-10 mRNA following systemic treatment with interferon gamma. J Leukoc Biol 1992; **52**: 27-33.

Ohmori Y, Wyner L, Narumi S, Armstrong D, Stoler M, Hamilton TA. Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines *in vivo*. Am J Pathol 1993; **142**: 861-870.

Okazawa H, Motegi S, Ohyama N, Ohnishi H, Tomizawa T, Kaneko Y, Oldenborg PA, Ishikawa O, Matozaki T. Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system. J Immunol 2005; **174**: 2004-2011.

Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science 2000; **288**: 2051-2054.

Ormerod AD. Alefacept. Biogen. Curr Opin Investig Drugs 2003; **4**: 608-613.

Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Itoh K, Sasazuki T, Inoko H. A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. Genomics 2001; **71**: 263-270.

Pawlinski R, Pedersen B, Schabbauer G, Tencati M, Holscher T, Boisvert W, Andrade-Gordon P, Frank RD, Mackman N. Role of tissue factor and protease-activated receptors in a mouse model of endotoxemia. Blood 2004; **103**: 1342-1347.

Pearce EJ, Kane CM, Sun J. Regulation of dendritic cell function by pathogen-derived molecules plays a key role in dictating the outcome of the adaptive immune response. Chem Immunol Allergy 2006; **90**: 82-90.

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.

Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, Geiger SM, Hoffmann WH. *Litomosoides sigmodontis*: dynamics of the survival of microfilariae in resistant and susceptible strains of mice. Exp Parasitol 2000 A; **94**: 67-74.

Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, Geiger SM, Hoffmann WH. The role of nitric oxide in the innate resistance to microfilariae of *Litomosoides sigmodontis* in mice. Parasite Immunol 2000 B; **22**: 397-405.

Pfaff AW, Schulz-Key H, Soboslay PT, Taylor DW, MacLennan K, Hoffmann WH. *Litomosoides sigmodontis* cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis. Int J Parasitol 2002; **32**: 171-178.

Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, Wiegmann K, Ohashi PS, Kronke M, Mak TW. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. Cell 1993; **73**: 457-67.

Piessens WF, McGreevy PB, Piessens PW, McGreevy M, Koiman I, Saroso JS, Dennis DT. Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: specific cellular unresponsiveness to filarial antigens. J Clin Invest 1980; **65**: 172-179.

Rausch RL, Wilson JF, Schantz PM, McMahon BJ. Spontaneous death of *Echinococcus multilocularis*: cases diagnosed serologically (by Em2 ELISA) and clinical significance. Am J Trop Med Hyg 1987; **36**: 576-585.

Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH. NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H)cells. Nat Immunol 2002; **3**: 48-54.

Renz A, Wenk P. Intracellular development of the cotton-rat filaria *Litomosoides carinii* in the vector mite *Ornithonyssus bacoti*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1981; **75**: 166-168.

Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderon R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. Infect Immun 2002; **70**: 3656-3664.

Ruhenstroth-Bauer G, Scherer R, Hornberger M, Tongendorff G. Demonstration of antiinflammatory activity of fibrinogen and fibrinopeptides in rats. Inflammation 1981; **5**: 343-351.

Saeftel M, Arndt M, Specht S, Volkmann L, Hoerauf A. Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis. Infect Immun 2003; **71**: 6978-6985.

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

Saint Andre A, Blackwell NM, Hall LR, Hoerauf A, Brattig NW, Volkmann L, Taylor MJ, Ford L, Hise AG, Lass JH, Diaconu E, Pearlman E. The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in the pathogenesis of river blindness. Science 2002; 295: 1892-1895.

Sartono E, Kruize YC, Kurniawan A, Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Depression of antigen-specific interleukin-5 and interferon-gamma responses in human lymphatic filariasis as a function of clinical status and age. J Infect Dis 1997; **175**: 1276-1280.

Sartono E, Kruize YC, Kurniawan A, van der Meide PH, Partono F, Maizels RM, Yazdanbakhsh M. Elevated cellular responses and interferon-γ release after long-term diethylcarbamazine treatment of patients with human lymphatic filariasis. J Infect Dis 1995; **171**: 1683-1687.

Satoguina J, Mempel M, Larbi J, Badusche M, Loliger C, Adjei O, Gachelin G, Fleischer B, Hoerauf A. Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis). Microbes Infect 2002; **4**: 1291-1300.

Savioli L, Stansfield S, Bundy DA, Mitchell A, Bhati R, Engels D, Montresor A, Neira M, Shein AM. Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections: forging control efforts. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; **96**: 577-579.

Scherer R, Simon J, Abd-el-Fattah M, Ruhenstroth-Bauer G. The effect of fibrinopeptides A and B on experimental allergic encephalomyelitis. Clin Exp Immunol 1980; **40**: 49-59.

Schicker HJ. Die Echinokokkose des Menschen. Stand von Diagnose, Therapie und Prognose bei Echinokokkoseerkrankungen in Baden-Württemberg in den Jahren 1960-1972. Med. Dissertation, Tübingen 1976.

Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. Infect Immun 2003; **71**: 2422-2429.

Schoch C, Dugas M, Kern W, Kohlmann A, Schnittger S, Haferlach T. "Deep insight" into microarray technology. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2004; URL: http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/MicroarrayTechnology ID20045.html

Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, Paul WE. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; **90**: 10188-10192.

Semnani RT, Liu AY, Sabzevari H, Kubofcik J, Zhou J, Gilden JK, Nutman TB. *Brugia malayi* microfilariae induce cell death in human dendritic cells, inhibit their ability to make IL-12 and IL-10, and reduce their capacity to activate CD4+ T cells. J Immunol 2003; **171**: 1950-1960.

Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, Fabry Z. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. Int Immunol 2003; **15**: 59-69.

Sheng L, Li J, Qi BT, Ji YQ, Meng ZJ, Xie M. Investigation on correlation between expression of CD58 molecule and severity of hepatitis B. World J Gastroenterol 2006; **12**: 4237-4240.

Shi DZ, Li FR, Bartholomot B, Vuitton DA, Craig PS. Serum sIL-2R, TNFα and IFN-γ in alveolar echinococcosis. World J Gastroenterol 2004; **10**: 3674-3676.

Smith KD, Andersen-Nissen E, Hayashi F, Strobe K, Bergman MA, Barrett SL, Cookson BT, Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. Nat Immunol 2003; **4**: 1247-1253.

Spiegel A, Tall A, Raphenon G, Trape JF, Druilhe P. Increased frequency of malaria attacks in subjects co-infected by intestinal worms and *Plasmodium falciparum* malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; **97**: 198-199.

Summers RW, Elliott DE, Khurram Q, Urban JF Jr, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2003; **98**: 2034-2041.

Summers RW, Elliott DE, Urban JF Jr, Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. Gut 2005 B; **54**: 87-90.

Summers RW, Elliott DE, Urban JF Jr, Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. Gastroenterology 2005 A; **128**: 825-832.

Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. Int Immunopharmacol 2001; **1**: 625-635.

Tang NL, Chan PK, Wong CK, To KF, Wu AK, Sung YM, Hui DS, Sung JJ, Lam CW. Early enhanced expression of interferon-inducible protein-10 (CXCL-10) and other chemokines predicts adverse outcome in severe acute respiratory syndrome. Clin Chem 2005; **51**: 2333-2340.

Tawill S, Le Goff L, Ali F, Blaxter M, Allen JE. Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. Infect Immun 2004; **72**: 398-407.

Taylor MJ, Cross HF, Ford L, Makunde WH, Prasad GB, Bilo K. *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. Parasite Immunol 2001; **23**: 401-409.

Taylor MD, Harris A, Nair MG, Maizels RM, Allen JE. F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. J Immunol 2006; **176**: 6918-6927.

Taylor MD, LeGoff L, Harris A, Malone E, Allen JE, Maizels RM. Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance *in vivo*. J Immunol 2005; **174**: 4924-4933.

Taylor MJ, Cross HF, Bilo K. Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. J Exp Med 2000; **191**: 1429-1436.

Taylor MJ, Cross HF, Mohammed AA, Trees AJ, Bianco AE. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. Parasitology 1996; **112**: 315-322.

Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA Jr. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. J Immunol 2001; **167**: 5294-5303.

Turner JD, Langley RS, Johnston KL, Egerton G, Wanji S, Taylor MJ. *Wolbachia* Endosymbiotic Bacteria of *Brugia malayi* Mediate Macrophage Tolerance to TLR- and CD40-Specific Stimuli in a MyD88/TLR2-Dependent Manner. J Immunol 2006; **177**: 1240-1249.

Udono H, Srivastava PK. Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity. J Exp Med 1993; **178**: 1391-1396.

Volkmann L, Bain O, Saeftel M, Specht S, Fischer K, Brombacher F, Matthaei KI, Hoerauf A. Murine filariasis: interleukin 4 and interleukin 5 lead to containment of different worm developmental stages. Med Microbiol Immunol 2003; **192**: 23-31.

Vuitton DA, Bresson-Hadni S, Laroche L *et al.* Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989; **78**: 67-74.

Vuitton DA. Echinococcosis and allergy. Clin Rev Allergy Immunol 2004; **26**: 93-104.

Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis. Protection of the host or of the parasite? Acta Trop 2003; **85**: 119-32.

Walker M, Baz A, Dematteis S *et al.* Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. Infect Immun 2004; **72**: 527-36.

Wang J, Reinherz EL. Structural basis of cell-cell interactions in the immune system. Curr Opin Struct Biol 2000; **10**: 656-661.

Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. Shock 2004; **22**: 460-466.

Wellinghausen N, Gebert P, Kern P. Interleukin (IL)-4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. Acta Trop 1999; **73**: 165-174.

WHO. Guidelines for treatment of cystic and alveolar echinococcosis. Memorandum of the WHO Informal Working Group on Echinococcosis. Bull World Health Organ 1996, **74:** 231.

Wickelgren I. Immunotherapy. Can worms tame the immune system? Science 2004; **305**: 170-171.

Wildenburg G, Krömer M, Büttner DW. Dependence of eosinophil granulocyte infiltration into nodules on the presence of microfilariae producing *Onchocerca volvulus*. Parasitol Res 1996; **82**: 117-124.

Wilson NS, Behrens GM, Lundie RJ, Smith CM, Waithman J, Young L, Forehan SP, Mount A, Steptoe RJ, Shortman KD, de Koning-Ward TF, Belz GT, Carbone FR, Crabb BS, Heath WR, Villadangos JA. Systemic activation of dendritic cells by Toll-like receptor ligands or malaria infection impairs cross-presentation and antiviral immunity. Nat Immunol 2006; **7**: 165-172.

Wilson JF, Rausch RL, McMahon BJ, Schantz PM. Parasiticidal effect of chemotherapy in alveolar hydatid disease: review of experience with mebendazole and albendazole in Alaskan eskimos. Clin Infect Dis 1992; **15:** 234-249.

Yan Y, Inuo G, Akao N, Tsukidate S, Fujita K. Down-regulation of murine susceptibility to cerebral malaria by inoculation with third-stage larvae of the filarial nematode *Brugia pahangi*. Parasitology 1997; **114**: 333-338.

Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. J Immunol 1995; **155**: 5483-5486.

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science 2002; **296**: 490-494.

Ye S, Guo Q, Tang JP, Yang CD, Shen N, Chen SL. Could 2'5'-oligoadenylate synthetase isoforms be biomarkers to differentiate between disease flare and infection in lupus patients? A pilot study. Clin Rheumatol 2006; in press.

Zaccone P, Fehervari Z, Jones FM, Sidobre S, Kronenberg M, Dunne DW, Cooke A. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. Eur J Immunol 2003; **33**: 1439-1449.

Zang X, Atmadja AK, Gray P, Allen JE, Gray CA, Lawrence RA, Yazdanbakhsh M, Maizels RM. The serpin secreted by *Brugia malayi* microfilariae, Bm-SPN-2, elicits strong, but short-lived, immune responses in mice and humans. J Immunol 2000; **165**: 5161-5169.

Zang X, Taylor P, Wang JM, Meyer DJ, Scott AL, Walkinshaw MD, Maizels RM. Homologues of human macrophage migration inhibitory factor from a parasitic nematode. Gene cloning, protein activity, and crystal structure. J Biol Chem 2002; **277**: 44261-44267.

Zang X, Yazdanbakhsh M, Jiang H, Kanost MR, Maizels RM. A novel serpin expressed by blood-borne microfilariae of the parasitic nematode *Brugia malayi* inhibits human neutrophil serine proteinases. Blood 1999; **94**: 1418-1428.

Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in immunology and diagnosis of hytatid disease. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 18-36.

7 Anhang

7.1 Manuskript: Hübner et al. 2006

Mit freundlicher Genehmigung von *Clinical and Experimental immunology*, der British Society for Immunology and Blackwell Publishing.

Dieser Artikel erschien in British Society for Immunology, *Clinical and Experimental Immunology* (2006), **145**: 243-251.

The definitive version is avaiable at www.blackwell-synergy.com

Echinococcus multilocularis metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by PBMC in alveolar echinococcosis patients

Marc P. Hübner[1], Burkhard J. Manfras[2,3], Maxi C. Margos[1], Dorothee Eiffler[1], Wolfgang H. Hoffmann[1], Hartwig Schulz-Key[1], Peter Kern[2], Peter T. Soboslay[1]

Institute for Tropical Medicine, University of Tübingen, D-72074 Tübingen, Germany[1], *Section of Infectious Diseases and Clinical Immunology, University of Ulm, D-89081 Ulm, Germany*[2], *Endokrinologikum Ulm, D-89073 Ulm, Germany*[3]

Short Title:

Immune modulation by *Echinococcus multilocularis*

Keywords:

Echinococcus multilocularis, alveolar echinococcosis, cytokine and chemokine responses

Correspondence

P. T. Soboslay, Institute for Tropical Medicine, University of Tübingen

Wilhelmstr. 27, 72074 Tübingen, Germany

e-mail: peter.soboslay@uni-tuebingen.de

Tel.: +49-7071-2980230, Fax.: +49-7071-295996

Summary

Infection with the cestode *Echinococcus multilocularis* causes human alveolar echinococcosis (AE), a life-threatening disease affecting primarily the liver. Despite the severity of AE, clinical symptoms often develop only many years after infection, which suggests that *E. multilocularis* has developed mechanisms which depress anti-parasite immune response, thus favouring immune evasion.

In this study we examined the production of cytokines, chemokines and the expression of CD molecules on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from AE patients and healthy controls in response to *E. multilocularis* metacestode culture supernatant, viable *E. multilocularis* vesicles and *E. multilocularis* vesicle fluid antigen *in vitro*. After 48 h of co-culture, *E. multilocularis* metacestode culture supernatant and *E. multilocularis* vesicles, depressed the release of the proinflammatory cytokine interleukin (IL)-12 by PBMC. This effect was dose dependent and a suppression of tumor necrosis factor (TNF)-α and IL-12 was even observed when PBMC were activated with lipopolysaccharide (LPS). Comparing proinflammatory cytokine release by AE patients and controls showed that the release of IL-12 and TNF-α was reduced in AE patients, which was accompanied by an increased number of $CD4^+$ $CD25^+$ cells and a reduced release of the Th2-type chemokine CCL17 (thymus and activation regulated chemokine, TARC), suggesting an anti-inflammatory response to *E. multilocularis* metacestode in AE patients. Instead the production of interferon (IFN)-γ and the expression of CD28 on $CD4^+$ T cells were increased in PBMC from AE patients when compared to the controls. This was accompanied by a higher release of the Th2-type chemokine CCL22 (macrophage derived chemokine, MDC) supporting that *E. multilocularis* also generates proinflammatory immune responses. These results indicate that *E. multilocularis* antigens modulated both regulatory and inflammatory Th1 and Th2 cytokines and chemokines. Such a mixed profile might be required for limiting parasite growth but also for reducing periparasitic tissue and organ damage in the host.

Introduction

In infected humans, proliferating metacestodes of *Echinococcus multilocularis* progressively infiltrate infested tissues and organs, mostly liver, and cause alveolar echinococcosis (AE). Infection is often undetected for many years of parasite persistence, and often found only incidentally by imaging diagnostic techniques [1]. Epidemiological and clinical data, e.g. the high prevalence of *E. multilocularis* in foxes in endemic areas but the very low incidence of AE in the human population, suggest that exposure to *E. multilocularis* does not progress to clinical disease in all cases because many subjects present abortive and spontaneously healed lesions after infection [2-5]. The progressive parasite growth in human host tissues appears not to cause fulminant and exacerbated inflammation and immediate organ damage, but often a "latent", non-apparent disease. This supports that *E. multilocularis* metacestodes have developed mechanisms which depress anti-parasite responses favouring immune evasion, and, moreover, metacestodes may restrict or modulate inflammatory responses which could cause tissue damage and pathology to the human host. Cellular effector mechanisms are considered to be the key defence against metacestode growth and dissemination [6]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from AE patients generate substantial amounts of Th1 and Th2 cytokines and chemokines when activated with *E. multilocularis* metacestode antigens or viable *E. multilocularis* vesicles. While interleukin (IL)-5 was found to be the predominant cytokine produced by activated PBMC in AE patients [7], the levels of tumor necrosi factor (TNF)-α, IL-10, IL-12, IL-13 and sIL-2R in sera correlated with the actual state of clinical disease [8-11]. Therefore, regulatory and inflammatory immune mediators, notably cytokines and chemokines, may contribute to tissue and organ damage and disease progression in AE patients [12-14]. However, metacestodes and their secreted products will also depress proinflammatory cytokine and proliferative responses over time [12, 15]. In the present study we analysed the anti-inflammatory properties of *E. multilocularis* metacestodes on the cellular production of proinflammatory cytokines and Th2-type chemokines in AE patients and healthy controls. Furthermore, the potential of *E. multilocularis* metacestodes to promote $CD4^+$ $CD25^+$ differentiation and the capacity of secretory products of *E. multilocularis* to modulate inflammatory cytokine generation, also after lipopolysaccharide (LPS)-induced activation, were examined. We found that proliferating *E. multilocularis* selectively stimulated Th2-type chemokine release, depressed proinflammatory cytokines, also in the presence of LPS, and viable vesicles of *E. multilocularis* promoted $CD4^+$ $CD25^+$ T cell differentiation in AE patients. While such parasite-host interplay may only limit metacestode growth and dissemination to

some extent, it may favour parasite growth without generating inflammation and immediate organ damage to the host.

Materials and methods

Study participants

The study population consisted of a total of 28 AE patients admitted to the University Hospitals of Ulm and 55 healthy controls received from the University Hospitals of Tübingen. The AE patients and infection-free controls came from south-western Germany (Baden-Württemberg and Bayern). The Echinococcosis Centre and University Clinics of Ulm and the Clinics of Tübingen are situated in an endemic area for *E. multilocularis*, both towns being 70 km apart. The mean age of AE patients was 57.1 years, ranging from 18 to 79 years. Seventeen AE patients were female, 11 male. In the AE patient group were 10 cured patients, 12 patients had stable infections and six patients had progressive AE. The control group for fluorescein activated cell sorter (FACS) analysis and cytokine/chemokine determination consisted of 34 healthy controls (16 female, 18 male) with an mean age of 40.4 years (23-63 years). Diagnosis of AE was achieved by positive imaging, serology and histology, and most patients were re-examined during follow-up. All patients gave written consent to participate in this study and approval for the investigation was obtained from the ethical board of the University Clinics of Ulm (Ethikkommission Antrag Nr. 71/2004). All patients except five were treated with benzimidazole (albendazole or mebendazole).

Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Whole blood samples of donor blood from AE patients as well as controls were processed at the blood transfusion centre at University Clinics of Ulm. PBMC from AE patients and healthy endemic controls were isolated by Ficoll-Paque (Pharmacia, Freiburg, Germany) density gradient centrifugation of heparinized venous peripheral blood. Cell culture experiments were conducted as described previously [12]. Briefly, PBMC were adjusted to 1 x 10^7/ml in complete medium: RPMI-1640 containing 25 mM Hepes, 2 mM l-glutamine (Gibco, Eching, Germany), 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Biochrom KG, Berlin, Germany), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B (Sigma, St. Louis, USA). PBMC (1 x 10^7) were plated in duplicate in 48-well flat-bottomed tissue culture plates (Costar 3548, Nem York, USA) and co-cultured with either 60 µg/ml EmVF (*E. multilocularis* vesicle fluid antigen), 5 µg/ml *Escherichia coli* LPS (026:B6; Sigma, St. Louis, USA), 5 µg/ml phytohaemagglutinin (PHA) (Sigma, St. Louis, USA), EmMed (*E. multilocularis* metacestode

culture supernatant) or 5-10 EmVes (viable *E. multilocularis* metacestode vesicles) both constituting 20% of the final cell culture volume and incubated for 24-96 h at 37°C, saturated humidity and 5% CO_2. Cells from AE patients were cultured in corresponding concentrations. To analyse the effect of EmMed and EmVes on LPS induced cytokine release by PBMC, cells were adjusted to 2 x 10^6/ml in complete medium (as above) and preincubated for 2 h in the presence of EmMed and EmVes before stimulation with 100 ng/ml *E. coli* LPS (026:B6; Sigma).

***In vitro* culture of *E. multilocularis* metacestodes**

In vitro culture of *E. multilocularis* metacestodes was carried out as described previously [10, 14]. Briefly, metacestode tissues were removed aseptically from the peritoneal cavity of infected jirds (*Meriones unguiculatus*) and cut into tissue blocks. These were cultivated in complete medium (as above) at 37°C, saturated humidity and 5% CO_2. Several weeks later metacestodes started to proliferate and produce daughter vesicles. Twice a week culture medium was renewed and *E. multilocularis* metacestode culture supernatant (EmMed) and vesicles (EmVes) were collected and used immediately for *in vitro* stimulation of PBMC or stored below -20°C for further use.

Preparation of *E. multilocularis* vesicle fluid antigen (EmVF)

Cryopreserved *E. multilocularis* vesicles were homogenized and sonificated (30% intensity, pulse 1 s for 8 min) on ice. The vesicle homogenate was centrifuged by 5000 g for 30 min at 4°C. The supernatant was sterile-filtrated (0.22 µm). The protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) protein determination kit (Pierce, Rockfort, IL, USA).

Determination of cytokine and chemokine production by PBMC

Cell-free culture supernatants were collected after 24, 48, 72 and 96 h and stored below -20°C until further use. Cytokine and chemokine secretion by stimulated PBMC was quantified by sandwich ELISA using monoclonal and polyclonal antibodies for TNFα, IL-12 + p40, IFN-γ (Biosource, Ratingen, Germany), macrophage-derived chemokine (MDC) and thymus and activation regulated chemokine (TARC) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) as recommanded by the manufacturers and as described previously [12].

FACS analyse

Freshly isolated PBMC were cultured at 37°C, with saturated humidity and 5% CO_2 in a concentration of 1 x 10^7 cells/ml in complete medium (as above) in the presence of either 60 µg/ml EmVF, 5 µg/ml *E. coli* LPS (026:B6) or EmVes constituting 20% of the final cell culture volume. After 24 h vesicles were carefully removed and the remaining supernatant and cells were collected and centrifuged by 400 g, 4°C for 5 min. Cells were stained for 30 min at a concentration of 4 x 10^5 cells/well in 96-well flatbottom plates (Costar, NY, USA). Staining was conducted with phycoerythrin (PE)-conjugated mouse IgG anti-human CD4 (BD PharMingen, San Diego, USA), PE-conjugated mouse IgG anti-human CD8 (BD PharMingen, San Diego, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse IgG anti-human CD25 (BD PharMingen, San Diego, USA) and FITC-conjugated mouse IgG anti-human CD28 (BD PharMingen, San Diego, USA). All staining was compared against the relevant isotype controls (IgG1 for FITC and IgG2α for PE). Following two washing steps with FACSflow (400 g, 4°C, 5 min) cells were resuspended with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% formaldehyde and stored overnight at 4°C. For FACS analyse a FACSCalibur running CellQuest Version 3.3 was used.

Statistical analysis

To analyse differences in concentrations of cytokines and chemokines between AE patients and controls, mean values over time (24, 48, 72 and 96 h) were determined. Significant differences between groups were determined after logarithmic transformation to stabilise the variance of data [log (pg/ml + 0.5)] for *t*-test. The level of significance was adjusted according to Bonferroni-Holm (25 tests; α=0.002).

To illustrate the influence of EmMed and EmVes on spontaneous or LPS-induced cytokine release, cytokine levels were expressed as mean in pg/ml or ng/ml ± s.e.m. Dunnett´s test was used for statistic analysis, and the variance of data was stabilised by logarithmic transformation [log (pg/ml + 0.5)]. The level of significance was adjusted according to Bonferroni-Holm (16 tests; α=0.0031).

For FACS analysis mean values of gated cells are given in % ± s.e.m. and differences between AE patients and controls were evaluated by *t*-test. For this analysis data were stabilised by converting percentage values to arcsin values [arcsin (square root of values in percentage/100)].

Results

Cytokine and chemokine production by AE patients and controls

PBMC from healthy controls and AE patients were stimulated *in vitro* with *E. multilocularis* antigen EmMed, EmVes, EmVF or the mitogen PHA and cellular production of the Th1 cytokines IL-12, TNF-α and IFN-γ, as well as the Th2 chemokines MDC and TARC (Table 1), were quantified by ELISA. Results from AE patients with cured, stable or progressive disease were grouped, as they showed no significant differences in cytokine and chemokine release after stimulation with *E. multilocularis* antigens or PHA/*E. coli* LPS, except for TNF-α in the presence of PHA. Furthermore, in those AE patients from our study who were receiving benzimidazole treatment, cytokine and chemokine production did not differ from those AE patients not being treated.

IL-12

Most AE patients showed a diminished spontaneous release of IL-12 when compared with healthy controls. Addition of antigens from *E. multilocularis* enhanced this effect, i.e. significantly reduced IL-12 production by AE patients compared to healthy controls in presence of EmVes (EmVes $P = 0.001$; EmMed $P = 0.01$; EmVF $P = 0.02$). Activation of PBMC with the mitogen PHA resulted in a similar IL-12 production by PBMC from AE patients and controls ($P = 0.10$).

TNF-α

Stimulation with EmVes and PHA increased in AE patients and controls TNF-α production, while EmMed and EmVF had no effect on TNF-α release. Production of the proinflammatory cytokine was constantly lower in AE patients compared to controls, i.e. cells from AE patients spontaneously released less TNF-α ($P = 0.003$) as well as after antigen stimulation with EmMed ($P = 0.003$), EmVes ($P = 0.0005$) and EmVF ($P = 0.04$). AE patients with acute infections ($n = 3$) produced higher amounts of TNF-α after PHA stimulation (16123 pg/ml, range 8124-25096 pg/ml) compared to AE patients with abortive infection (3942 pg/ml, range 875-6510 pg/ml; $n = 6$; $P = 0.03$).

IFN-γ

Spontaneous IFN-γ secretion did not differ significantly between AE patients and controls, but PBMC from AE patients tended to have a higher secretion of IFN-γ then controls. Stimulation with EmMed ($P = 0.01$) and EmVF ($P = 0.01$) enforced this effect clearly, however, PHA augmented production of IFN-γ by PBMC from controls, while stimulation with EmVF and PHA increased IFN-γ in AE patients.

MDC

Macrophage derived chemokine (MDC, CCL22) was released in higher amounts by PBMC from AE patients than by those from controls. This was observed in unstimulated cell cultures ($P = 0.006$) and also following activation with EmMed ($P < 0.002$), EmVes ($P < 0.002$), EmVF ($P = 0.02$) or PHA ($P < 0.02$). Interestingly, PBMC from AE patients released more MDC in the presence of EmMed, EmVF or the mitogen PHA as compared to their spontaneous production. In contrast, these antigens did not trigger PBMC from healthy controls to produce MDC, while EmVes even depressed MDC release when compared to unstimulated control cultures.

TARC

The spontaneous release of TARC (CCL17) by PBMC was reduced significantly in AE patients when compared to controls ($P = 0.0001$). This depression was preserved after stimulation with EmVes ($P = 0.009$), and also the combination with EmVF or *E. coli LPS* did not change TARC production. Although the TARC production was reduced in AE patients as compared to controls, EmMed and EmVF stimulated TARC release by PBMC in AE patients, whereas EmVes reduced TARC release by PBMC from controls.

FACS analysis of $CD4^+$ $CD25^+$ and $CD28^+$ T cells

FACS analysis was performed using PBMC stimulated with EmVes, EmVF or *E. coli* LPS. The unspecific binding of isotype controls (IgG1 and IgG2α) was always less than 1% (data not shown). The spontaneous expression of $CD4^+$ $CD25^+$ was elevated in AE patients´ PBMC compared to controls, and the contingent of $CD4^+$ $CD25^+$ cells increased three- to fivefold in AE patients´ PBMC after stimulation with EmVes or *E. coli* LPS compared to healthy controls (Table 2). Neither activation with *E. multilocularis* antigens nor *E. coli* LPS could change the expression of $CD4^+$ $CD25^+$ cells in both groups (Fig. 1).

Stimulation of PBMC with *E. multilocularis* antigens (EmMed and EmVF) increased activated $CD4^+$ $CD28^+$ cells in AE patients´ PBMC and in controls, while *E. coli* LPS did not (Table 2). AE patients´ PBMC expressed spontaneously markedly more $CD4^+$ $CD28^+$ than control PBMC, as well as after antigen ($P < 0.05$) or mitogen stimulation. In contrast the number of $CD8^+$ $CD28^+$ T cells was similar in both groups and antigen or mitogen stimulations showed no effect on $CD8^+$ $CD28^+$ expression.

Reduction of LPS induced IL-12 and TNF-α by EmMed and EmVes

The kinetics of IL-12 and TNF-α production by PBMC after LPS stimulation was determined in the presence of EmMed or EmVes. EmMed and EmVes were able to reduce the LPS-induced cytokine release of IL-12 and TNF-α when compared to cell cultures stimulated only with LPS (Fig. 2). This reduction was observable after 24 h and lasted until 96 h of incubation.

Reduction of spontaneously released IL-12 by EmMed and EmVes in a dose-dependent manner

To analyse the effect of EmMed and EmVes on the spontaneous production of IL-12 from PBMC, different concentrations of EmMed (2-40%) or increasing numbers of vesicles (1-8) were added to PBMC cell cultures. EmMed reduced the spontaneous IL-12 production in a dose-dependent manner after 48 and 96 h of incubation. A single vesicle of *E. multilocularis* (diameter 2-3 mm) was sufficent to reduce the spontaneous IL-12 production below the detection limit after 48 h (Fig. 3).

	EP (cured/stable/ progressive)	Medium	EmMed	EmVes	EmVF	PHA / *E. coli* LPS
IL-12	**BS** (*n* = 9)	**376** (0-2974)	**385** (0-3013) *	**510** (0-3915) **	**382** (n=8) (0-2394) *	**365** (n=8) (22-2179)
	EP (*n* = 12) (6/3/3)	**28** (0-133)	**14** (0-87)	**10** (0-49)	**24** (0-123)	**105** (0-368)
TNF-α	**BS** (*n* = 22)	**2958** (56-23039) *	**3534** (94-16871) *	**6396** (n=21) (215-24129) **	**2222** (117-14370) *	**16453** (n=6) (428-37182)
	EP (*n* = 23) (8/10/5)	**648** (0-3110)	**564** (0-3189)	**1425** (0-10013)	**1182** (0-8563)	**6987** (n=12) (875-25096)
IFN-γ	**BS** (*n* = 19)	**27** (0-101)	**29** (0-102) *	**46** (0-169)	**107** (0-881) *	**3170** (n=4) (250-10451)
	EP (*n* = 17) (6/7/4)	**132** (0-467)	**259** (0-1620)	**252** (0-1487)	**542** (0-2073)	**380** (n=6) (121-658)
MDC	**BS** (*n* = 8)	**2011** (207-6322) *	**2295** (48-8897) **	**279** (0-1572) **	**4089** (0-11855) *	**3700** (0-9247) *
	EP (*n* = 12) (6/3/3)	**4390** (1552-6622)	**6700** (2717-11441)	**3542** (0-11272)	**8255** (1855-15713)	**8494** (4841-11847)
TARC	**BS** (*n* = 14)	**396** (35-3509) **	**159** (32-425) *	**34** (12-64)	**316** (30-1187)	**74** (16-198)
	EP (*n* = 11) (3/6/2)	**32** (0-87)	**71** (4-172)	**34** (0-100)	**123** (4-549)	**119** (0-356)

Table 1. *In vitro* production of Th1 cytokines interleukin (IL)-12, tumor necrosis factor (TNF)-α and interferon (IFN)-γ as well as Th2 chemokines macrophage derived chemokine (MDC) and thymus and activation regulated chemokine (TARC) by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from alveolar echinococcosis patients (EP) and infection-free controls (BS) is shown in pg/ml as means and ranges. Spontaneous (medium) cytokine/chemokine production or in response to *Echinococcus multilocularis* metacestode culture supernatant (EmMed), vesicles (EmVes), vesicle fluid antigen (EmVF), phytohaemagglutinin (PHA) and *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) (used only for TARC), respectively, are shown. The number of AE patients tested for cytokine and chemokine production as well as their number according to their state of infection (cured/stable/progressive) is indicated for each experiment. Concentrations of cytokines/chemokines released into the cell culture supernatant were quantified after 24, 48, 72 and 96 h by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and means over time are given. Concentration of MDC was analysed after 96 h. Differences in cytokine/chemokine production between alveolar echinococcosis patients and controls were evaluated as log values [log (pg/ml + 0.5)] by *t*-test and the level of significance adjusted by Bonferroni-Holm (*$P < 0.05$, Bonferroni-Holm: 25 tests, **$\alpha = 0.002$).

	Medium		EmVes		EmVF		*E. coli* LPS	
	BS	AE	BS	AE	BS	AE	BS	AE
$CD4^+ CD28^+$	27.2±6.5	46.5±5.5	**34.4±5.5**	**53.9±4.7**	**32.4±6.0**	**53.2±4.5**	27.6±6.8	46.2±9.9
$CD8^+ CD28^+$	14.6±3.3	15.4±3.2	14.6±3.2	16.5±3.1	15.7±4.4	15.4±3.0	10.5±3.6	16.7±3.3
$CD4^+ CD25^+$	3.7±1.4	7.7±1.8	**3.5±1.4**	**26.1±9.3**	6.0±2.9	10.0±2.5	**4.9±1.6**	**29.2±8.1**

Table 2. Fluorescein activated cell sorter (FACS) analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from alveolar echinococcosis patients (AE) and healthy controls (BS) after 24 h of *in vitro* cultivation with viable *E. multilocularis* vesicles (EmVes), vesicle fluid antigen (EmVF), *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) or without stimulation (medium). Mean values of gated cells as percentage ± s.e.m. from $n = 7$ AE patients or $n = 8$ BS are shown. Cell surface CD marker expression was compared between patients and controls by *t*-test and significant differences between groups ($P < 0.05$) are shown in bold letters. For *t*-test analysis the data were stabilised by converting percentage values to arcsin values [arcsin(square root of values in percentage/100)].

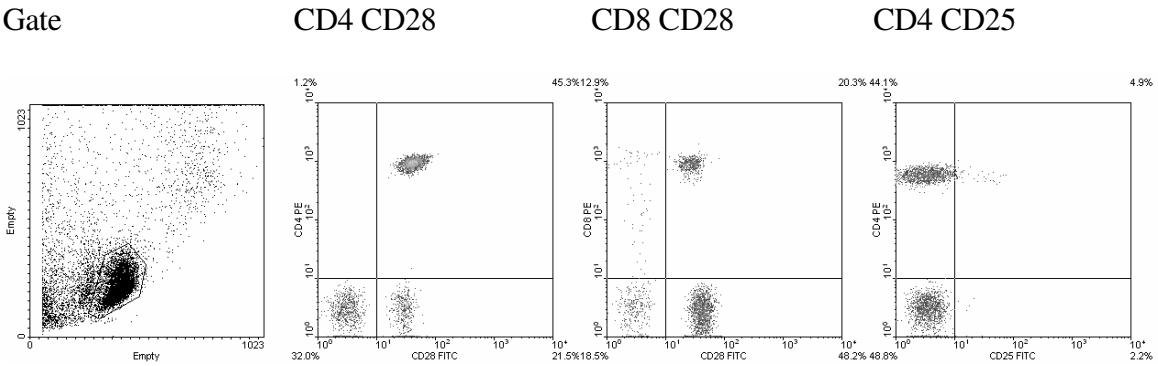


Fig. 1. Representative individual fluorescein activated cell sorter (FACS) analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated from an alveolar echinococcosis patient after 24 h of *in vitro* cultivation. The plots show side scatter/forward scatter (FSC/SSC) gated lymphocytes as well as $CD4^+ CD28^+$, $CD8^+ CD28^+$ and $CD4^+ CD25^+$ cells.

TNF-α **IL-12**

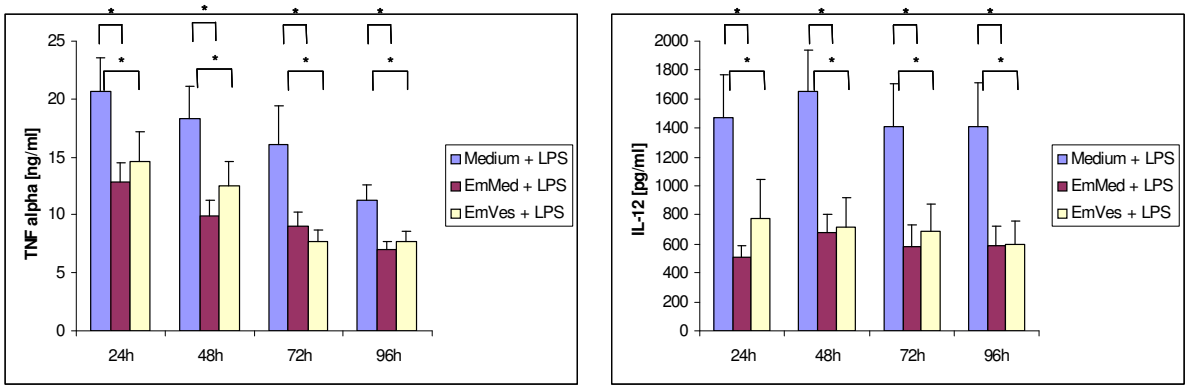


Fig. 2. Kinetics of tumor necrosis factor (TNF)-α (ng/ml ± s.e.m.) and interleukin (IL)-12 (pg/ml ± s.e.m.) production *in vitro* in the presence of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) by peripheral blood mononuclear cells from healthy donors is shown. Cells were preactivated with 100 ng/ml *E. coli* LPS and spontaneous cytokine production (medium + LPS, n = 15 and n = 13) or in response to *Echinococcus multilocularis* metacestode culture supernatant (EmMed + LPS, n = 11) as well as viable vesicles (EmVes + LPS, n = 8) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after 24, 48, 72 and 96 h of incubation. Dunnett´s test was used for statistic analysis, and the data were stabilised by logarithmic transformation [log (pg/ml + 0.5)]. The level of significance was adjusted according to Bonferroni-Holm (16 test; *α = 0.0031).

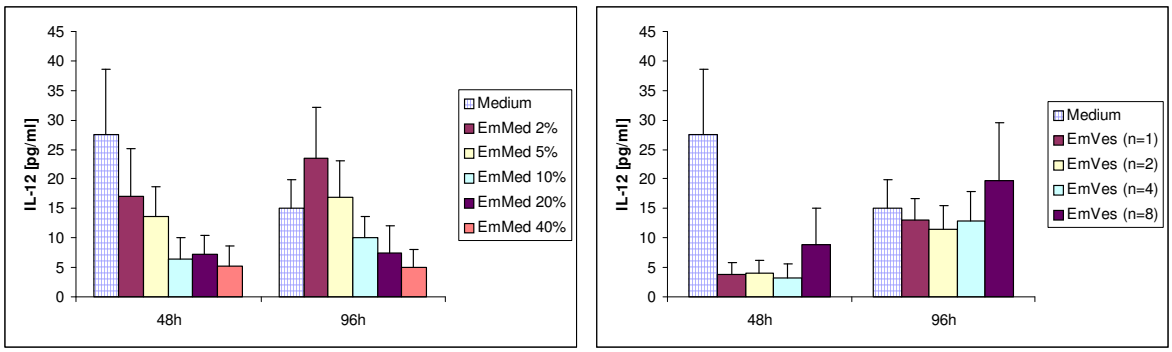


Fig. 3. *In vitro* production of interleukin (IL)-12 (pg/ml ± s.e.m.) by peripheral blood mononuclear cells from healthy donors (n = 6). Spontaneous IL-12 release (medium) or in response to different concentrations of *Echinococcus multilocularis* metacestode culture supernatant (EmMed 2-40%) as well as increasing numbers of viable vesicles (EmVes 1-8) are shown.

Discussion

Severe alveolar echinococcosis (AE) is associated with a general immune suppression [13, 16], while Th2-type responses will favour parasite growth and disease progression, and dominant Th1-type cytokines and vigorous lymphocyte proliferation are linked with protection and abortive AE lesions [17, 18]. Furthermore, *E. multilocularis*-derived molecules could inhibit and modulate cellular immune responses – not only by polarizing cytokine profiles [12], suppressing proliferation of blood cells [15] and the accessory cell function and the capacity of macrophages to present antigens [19], but also by impeding the generation of $CD4^+$ memory cells [20]. In the present study, we showed that *E. multilocularis* metacestode antigens promoted the expression of $CD25^+$ on $CD4^+$ T cells, i.e. suggesting a differentiation into regulatory T cells (Table 2). As CD25 is inducible on both Th1- as well as Th2-type helper cells, and is also present on other effector cell populations, e.g. activated B cells, dendritic cells and monocytes, further detailed studies should include CD25 high or low level of expression together with forkhead box P3 (FoxP3) and intracellular cytokine profiling to support these results. The baseline expression of the IL-2 receptor CD25 on $CD4^+$ cells was elevated on PBMC from AE patients (Table 2) and stimulation with *E. multilocularis* vesicles further increased CD25 expression on T cells. Previously, $CD25^+CD11b^-$ cells, identified morphologically as macrophages, were observed in the periparasitic cellular lining around *E. multilocularis* metacestodes [21]. Such cells were described as monocytes recruited to the intestine with an acquired profound inflammatory anergy, i.e. they will not produce inflammatory cytokines [22]; these observations add to our understanding of how *E. multilocularis* metacestodes may evade host immune surveillance. However, a probable explanation for a greater frequency of CD25 is more "activated" CD4 cells – as observed for CD28. The higher numbers of activated $CD4^+$ $CD28^+$ T cells in AE patients of this study (Table 2) suggested that activated $CD4^+$ cells may be present around and within the periparasitic granulomas caused by *E. multilocularis* metacestodes. CD28 is a co-stimulator promoting T cell proliferation, cytokine production, T cell effector functions and antibody production. In addition, peripheral blood cells from AE patients secreted the CC chemokines MDC/CCL22 and TARC/CCL17 in response to *E. multilocularis* metacestode antigens– both attract monocytes, lymphocytes, eosinophils and basophils to numerous organs including the liver, lung and dermal tissues [23]. MDC and TARC are implicated in chronic inflammatory skin disease and systemic sclerosis [24, 25]; they were found elevated in helminth infection with *Paragonimus westermani* [26] and *Onchocerca volvulus* [27], and systemic neutralization of TARC diminished granuloma formation in mice challenged with *S. mansoni* eggs [28].

The extent to which MDC or TARC may contribute to metacestode growth or healing of AE lesions remains unknown. Our observations suggest that the reduced levels of TARC, released by PBMC from AE patients after stimulation with *E. multilocularis* metacestode antigens (Table 1), may prevent the pathological features of lesions induced by infection with *E. multilocularis*. In contrast, the elevated MDC production by PBMC from AE patients (Table 1) may recruit effector cells into periparasitic tissues, thus supporting the development of efficient granulomas which restrain metacestode growth and dissemination and favor the outcome of infection. Clinical observations in AE patients and data from mass screenings have identified abortive cases where AE was cured spontaneously [3,4,8] and it remains to be determined how these chemokines contribute to clearance or parasite persistence.

As protection and abortive AE lesions were linked with dominant Th1-type cytokine responses [6,29,30], the elevated IFN-γ production by PBMC in AE patients following stimulation with metacestode culture supernatant or vesicle fluid antigen (Table 1) may slow progression of lesions and help to stop larval development [18]. Similarly, Shi *et al.* [9] have shown elevated IFN-γ concentrations in sera from AE patients irrespective of their stage of disease, and suggested that IFN-γ may have to act in synergy with other factors to slow parasite growth or to achieve curative effects.

The constantly diminished TNF-α release by PBMC in response to *E. multilocularis* antigens in patients from this study may indicate that metacestode vesicles will actively modulate the host immune responses, which may facilitate parasite survival. As necrosis and fibrosis are the main pathological features of echinococcosis, the cellular immune response, especially TNF-α synthesis, was considered responsible for clinical complications [21]. The AE patients studied here were with cured, stable or progressive disease and their PBMC secreted similar amounts of TNF-α in response to *Echinococcus multilocularis* antigens or PHA/*E. coli* LPS, except that the PHA-induced TNF-α release was stronger in cases with a progressive AE as compared to those with a cured AE. An augmented production of TNF-α was seen in AE patients with severe tissue damage [9], while no TNF-α mRNA expression was detected in abortive lesions [21]. Therefore, the depressed TNF-α release, in response to *E. multilocularis* antigens, by cells from patients appears as an immune adaptation to prevent inflammatory host damage.

Furthermore, the Th1-type cytokine IL-12 was reduced in AE patients compared to controls (Table 1) and this has been observed previously in sera from AE patients at distinct states of infection [10]. Suppression of the cellular IL-12 production was mediated by *E. multilocularis* metacestode culture supernatant in a dose-dependent manner (Fig. 3), suggesting that excretory/secretory products released by *E. multilocularis* will mediate this effect. In addition,

viable *E. multilocularis* vesicles depress IL-12 release by PBMC below the detection limit after 48 h of co-culture, and a single vesicle sufficed to mediate this effect, but after 96 h of co-culture these suppressive effects vanished. Therefore, *E. multilocularis* metacestode culture supernatant as well as viable vesicles diminished inflammatory cytokine releases of IL-12 and TNF-α after LPS stimulation after 24-96 h of co-culture (Fig. 2). This shows that *E. multilocularis* metacestodes have the potential to depress systemic inflammatory responses also induced by non-parasite derived molecules. Parasite antigens with the capacity to inhibit TNF-α, and other cytokines are present in a wide range of helminth parasites; ES-62, a phosphorylcholin-containing glycoprotein from *Acanthocheilonema viteae* inhibits TNF-α, IL-6 and IFN-γ release [31]. Soluble egg antigens from *Schistosoma mansoni* [32], nematode cystatins [33] and the carbohydrate-rich molecules released into the parasite culture medium and contained in vesicles of *E. multilocularis* [15] have suppressive effects on mitogen [concavalin A (ConA)] or crude parasite extract-induced cellular proliferation. Parasite extracts, and also entire parasites, have intensively been studied for their anti-inflammatory [32-34], anti-allergic [35, 36] or anti-autoimmunologic [31, 37-39] potential, but *E. multilocularis* has received little attention, and therefore the robust anti-inflammatory capacity of metacestode-derived molecules merits further study.

In summary, proliferating metacestodes of *E. multilocularis* were found to depress proinflammatory cytokine responses even when PBMC were preactivated with LPS; they promoted $CD4^+$ $CD25^+$ T cell differentiation in AE patients and stimulated selectively Th2-type chemokine release. Such an immune modulatory capacity of *E. multilocularis* metacestodes may favour parasite growth and dissemination, limit adverse inflammatory and clinical effects to the host and may contribute to the often unnoticed progression of alveolar echinococcosis.

Acknowledgement

This work was supported by the *fortüne*-programme of the University Hospital of Tübingen (grants no. 1246-0-0 and 1041-0-0). M. P. Hübner was supported by the Deutsche Gesellschaft für Pneumologie, the National Genome Research Network (NGFN)-program of the BMBF (grant no. 01GSO403). For statistical consultations, data analyses and help in manuscript preparation we thank Professor Dr K. Dietz from the Department of Medical Biometry, University of Tübingen.

References

1 Gottstein B, Hemphill A. Immunopathology of echinococcosis. Chem Immunol 1997; **66**:177-208.

2 Gottstein B, Saucy F, Deplazes P *et al.* Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with disease incidence in humans? Emerg Infect Dis 2001; **7**:408-12.

3 Bresson-Hadni S, Laplante JJ, Lenys D *et al.* Seroepidemiologic screening of *Echinococcus multilocularis* infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg 1994; **51**:837-46.

4 Rausch RL, Wilson JF, Schantz PM, McMahon BJ. Spontaneous death of *Echinococcus multilocularis*: cases diagnosed serologically (by Em2 ELISA) and clinical significance. Am J Trop Med Hyg 1987; **36**:576-85.

5 Gottstein B, Felleisen R. Protective immune mechanisms against the metacestode of Echinococcus multilocularis. Parasit Today 1995; **11:**320-6.

6 Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis. Protection of the host or of the parasite? Acta Trop 2003; **85**:119-32.

7 Sturm D, Menzel J, Gottstein B, Kern P. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. Infect Immun 1995; **63**:1688-97.

8 Godot V, Harraga S, Beurton I *et al.* Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. Clin Exp Immunol 2000; **121**:484-90.

9 Shi DZ, Li FR, Bartholomot B, Vuitton DA, Craig PS. Serum sIL-2R, TNFα and IFN-γ in alveolar echinococcosis. World J Gastroenterol 2004; **10**:3674-6.

10 Dreweck CM, Soboslay PT, Schulz-Key H, Gottstein B, Kern P. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. Parasite Immunol 1999; **21**:433-8.

11 Kilwinski J, Jenne L, Jellen-Ritter A, Radloff P, Flick W, Kern P. T lymphocyte cytokine profile at a single cell level in alveolar echinococcosis. Cytokine 1998; **11**:373-81.

12 Eger A, Kirch A, Manfras B, Kern P, Schulz-Key H, Soboslay PT. Pro-inflammatory (IL-1β, IL-18) cytokines and IL-8 chemokine release by PBMC in response to *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. Parasite Immunol 2003; **25**:103-5.

13 Vuitton DA. Echinococcosis and allergy. Clin Rev Allergy Immunol 2004; **26**:93-104.

14 Hemphill A, Stettler M, Walker M, Siles-Lucas M, Fink R, Gottstein B. *In vitro* culture of *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus vogeli* metacestodes: studies on the host-parasite interface. Acta Trop 2003; **85**:145-55.

15 Walker M, Baz A, Dematteis S *et al.* Isolation and characterization of a secretory component of *Echinococcus multilocularis* metacestodes potentially involved in modulating the host-parasite interface. Infect Immun 2004; **72**:527-36.

16 Emery I, Liance M, Deriaud E, Vuitton DA, Houin R, Leclerc C. Characterization of T-cell immune responses of *Echinococcus multilocularis*-infected C57BL/6J mice. Parasite Immunol 1996; **18**:463-72.

17 Bresson-Hadni S, Vuitton DA, Lenys D, Liance M, Racadot E, Miguet JP. Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. I. Lymphocyte reactivity to *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989; **78**:61-6.

18 Vuitton DA, Bresson-Hadni S, Laroche L *et al.* Cellular immune response in *Echinococcus multilocularis* infection in humans. II. Natural killer cell activity and cell subpopulations in the blood and in the periparasitic granuloma of patients with alveolar echinococcosis. Clin Exp Immunol 1989; **78**:67-74.

19 Dixon JB. Echinococcosis. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 1997; **20**:87-94.
20 Manfras BJ, Reuter S, Wendland T, Boehm BO, Kern P. Impeded T_h1 CD4 memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with *Echinococcus multilocularis*. Int Immunol 2004; **16**:43-50.
21 Bresson-Hadni S, Petitjean O, Monnot-Jacquard B *et al.* Cellular localisations of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha mRNA in a parasitic granulomatous disease of the liver, alveolar echinococcosis. Eur Cytokine Netw 1994; **5**:461-8.
22 Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, Orenstein JM, Smith PD. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. J Clin Invest 2005; **115**: 66-75.
23 Kunkel EJ, Butcher EC. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. Immunity 2002; **16**:1-4.
24 Fujii H, Shimada Y, Hasegawa M, Takehara K, Sato S. Serum levels of a Th1 chemoattractant IP-10 and Th2 chemoattractants, TARC and MDC, are elevated in patients with systemic sclerosis. J Dermatol Sci 2004; **35**:43-51.
25 Nomura I, Gao B, Boguniewicz M, Darst MA, Travers JB, Leung DY. Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. J Allergy Clin Immunol 2003; **112**:1195-1202.
26 Katoh, S, Fukushima K, Matsumoto N *et al.* Accumulation of CCR4-expressing CD4+ T cells and high concentration of its ligands (TARC and MDC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with eosinophilic pneumonia. Allergy 2004; **58**:518-23.
27 Fendt J, Hamm DM, Banla M *et al.* Chemokines in onchocerciasis patients after a single dose of ivermectin. Clin Exp Immun 2005; **142**:318-26.
28 Jakubzick C, Wen H, Matsukawa A, Keller M, Kunkel SL, Hogaboam CM. Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg-induced pulmonary granuloma formation in mice. Am J Pathol 2004; **165**:1211-21.
29 Emery I, Leclerc C, Sengphommachanh K, Vuitton DA, Liance M. *In vivo* treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. Parasite Immunol 1998; **20**:81-91.
30 Amiot F, Vuong P, Defontaines M, Pater C, Dautry F, Liance M. Secondary alveolar echinococcosis in lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor-alpha deficient mice: exacerbation of *Echinococcus multilocularis* larval growth is associated with cellular changes in the periparasitic granuloma. Parasite Immunol 1999; **21**:475-83.
31 McInnes IB, Leung BP, Harnett M, Gracie JA, Liew FY, Harnett W. A novel therapeutic approach targeting articular inflammation using the filarial nematode-derived phosphorylcholine-containing glycoprotein ES-62. J Immunol 2003; **171**:2127-33.
32 Kane CM, Cervi L, Sun J *et al.* Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. J Immunol 2004; **173**:7454-61.
33 Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. Infect Immun 2003; **71**:2422-9.
34 Harnett W, Harnett MM, Leung BP, Gracie JA, McInnes IB. The anti-inflammatory potential of the filarial nematode secreted product, ES-62. Curr Top Med Chem 2004; **4**:553-9.
35 Mangan NE, Fallon RE, Smith P, Van Rooijen N, McKenzie AN, Fallon PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. J Immunol 2004; **173**:6346-56.

36 Pinto LA, Pitrez PM, Fontoura GR *et al.* Infection of BALB/c mice with *Angiostrongylus costaricensis* decreases pulmonary inflammatory response to ovalbumin. Parasite Immunol 2004; **26**:151-5.
37 Sewell D, Qing Z, Reinke E *et al.* Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. Int Immunol 2003; **15**:59-69.
38 Summers RW, Elliott DE, Urban JF Jr, Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. Gastroenterology 2005; **128**:1117-9.
39 Zaccone P, Fehervari Z, Jones FM *et al. Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. Eur J Immunol 2003; **33**:1439-49.

7.2 Lebenslauf

Geburtsdatum, -ort::	17.05.1977, Leonberg
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	Verheiratet, zwei Kinder
Schulausbildung:	1984-1988 Hanfbach-Grundschule, Möglingen 1988-1997 Hans-Grüniger-Gymnasium, Markgröningen Abitur 1997
Fremdsprachen:	Englisch und Französisch
Zivildienst:	1997-1998 Arbeiter-Samariter-Bund, Stuttgart
Studium:	1998-2000 Biologie-Vordiplom in Hohenheim, Stuttgart 2000-2003 Biologie-Hauptstudium in Tübingen Diplom Juli 2003 August 2003-August 2006 Promotion in Tübingen
Tätigkeiten neben dem Studium:	2001 Vierwöchiges Praktikum am Inst. für Tropenmedizin bei PD Dr. rer. nat. Dieter Kube. 2002-2003 Wissenschaftliche Hilfskraft bei PD Dr. med. Ralf Bialek am Institut für Tropenmedizin, Tübingen. 2004 Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs.4 Satz 2 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit 2005, 2006 Einwöchiges Unterrichten der Parasitologie an der MTA-Schule Esslingen
Diplomarbeit:	„Vergleich der Genexpressionsprofile von Darmepithelzellen vor und während der Infektion mit *Cryptosporidium parvum*“ am Institut für Tropenmedizin, Arbeitsgruppe Molekulare Parasitologie bei Dr. rer. nat. Ulrike Zelck an der Eberhard Karls Universität Tübingen.
Promotion:	„Immunmodulation durch *Litomosoides sigmodontis* (Nematoda, Filarioidea) und *Echinococcus multilocularis* (Cestoda): Auswirkungen einer Helmintheninfektion auf eine LPS-induzierte Sepsis und Identifizierung einer anti-inflammatorischen Substanz” am Institut für Tropenmedizin, Arbeitsgruppe Feldforschung bei Prof. Hartwig Schulz-Key an der Eberhard Karls Universität Tübingen.