

**Innate Resistenz gegen *Litomosoides sigmodontis*
(Nematoda, Filarioidea) in der Labormaus:**

**Untersuchungen zur Genetik, Genomik,
Parasitologie und Immunologie
Mikrofilariämieresistenz-kongener
Labormausstämme**

Der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften von

Stefan Schumacher

aus Bietigheim-Bissingen

vorgelegte

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

2006

Tag der mündlichen Prüfung:

07.09.2006

Dekan:

Prof. Dr. F. Schöffl

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. H. Schulz-Key

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. P. G. Kremsner

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen angefertigt. Folgenden Personen möchte ich an dieser Stelle ganz herzlich für ihre Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Hartwig Schulz-Key danke ich für die Betreuung dieser Arbeit sowie das Erstellen des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Peter Kreamsner danke ich für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Herrn Dipl.-Biol. Wolfgang Hoffmann und **Frau Dipl.-Biol. Anna Schmidt-Oehm** von der AG Feldforschung danke ich für die gute Zusammenarbeit. Wolfgang Hoffmann danke ich insbesondere für seine ständige fachliche Unterstützung und dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Projekt annähernd von Anfang bis Ende begleiten zu dürfen.

Herrn Dr. Andreas Lengeling, Leiter der Nachwuchsgruppe Infektionsgenetik in der Abteilung für Mikrobiologie der GBF, Braunschweig, danke ich für die Durchführung der Mikrosatellitenanalysen, den freundlichen Kontakt und seine Bereitschaft, mich in Theorie und Auswertung der Genomanalysen einzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dirk Busch und **Herrn Dr. Svetoslav Kalaydjiev** vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München danke ich für die in der Deutschen Mauslinik der GSF, Neuherberg, durchgeführten immunologischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Michael Bonin vom Institut für Humangenetik, Abteilung Medizinische Genetik, Tübingen, danke ich für die Durchführung der Genexpressionsanalysen in der Microarray Facility Tübingen.

Von den übrigen Mitarbeitern der AG Feldforschung danke ich insbesondere **Herrn Prof. Dr. Peter Soboslay** für viele anregende und hilfreiche Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Filarien und Filariosen.....	1
1.2	Wirtsimmunologie bei Infektionen mit extrazellulären Parasiten.....	2
1.3	Reaktionstypen des Menschen bei Filariosen.....	6
1.4	Das Filariose-Tiermodell.....	7
1.4.1	<i>Litomosoides sigmodontis</i> im Labor.....	10
1.4.2	Die Haus- bzw. Labormaus.....	11
1.4.2.1	Systematik.....	11
1.4.2.2	Die Hausmaus als Haus- und Labortier.....	11
1.4.2.3	Inzuchtstämme, kongene Stämme, Knockoutmutationen.....	12
1.5	Vererbung von Resistenzen gegen verschiedene Pathogene.....	14
1.6	Genetische Grundlagen der Resistenz von Labormäusen gegen <i>L. sigmodontis</i>	15
1.7	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Verwendete Labormausstämme.....	20
2.2	Haltung von <i>L. sigmodontis</i>	26
2.3	Narkose und Markieren der Versuchstiere.....	27
2.4	Gewinnung von Mikrofilarien aus Baumwollratten.....	27
2.5	Intravenöse Mikrofilarien- und Mediuminjektion.....	28
2.6	Vollblut- und Plasmaübertragung.....	29
2.7	Intrapleurale Mikrofilarieninjektion.....	29
2.8	Natürliche Infektion mit dem dritten Larvenstadium.....	29
2.9	Töten von Versuchstieren.....	30
2.10	Gewinnung und Implantation von L4 und Adultwürmern.....	30
2.11	Blutabnahme und Bestimmung der Mikrofilariendichte bei Mäusen.....	31
2.12	Injektion und Nachweis von Mikropartikeln.....	31
2.13	Hauttransplantation bei kongenen Mäusen.....	32
2.14	Genomanalyse von BALB/c x DBA/1-Kreuzungen.....	32
2.14.1	DNA-Isolierung.....	33
2.14.2	Mikrosatelliten-PCR.....	34

2.14.3	Statistische Auswertung der Genomanalyse.....	40
2.15	Genotypisierung weiterer Labormauskreuzungen.....	41
2.15.1	DNA-Isolierung.....	41
2.15.2	Mikrosatelliten-PCR.....	42
2.16	Genexpressionsanalysen bei Labormäusen nach Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	42
2.16.1	Genexpression nach Injektion von Mikrofilarien.....	43
2.16.1.1	Versuchstiere.....	43
2.16.1.2	Lungenentnahme.....	43
2.16.1.3	Probenaufarbeitung.....	44
2.16.1.4	Auswertung der Microarrays.....	44
2.16.2	Genexpression nach Implantation adulter Weibchen.....	47
2.16.2.1	Versuchstiere.....	47
2.16.2.2	Lungenentnahme und Probenaufarbeitung.....	47
2.16.2.3	Auswertung der Microarrays.....	48
2.17	Zelluläre und humorale Blutparameter.....	49
2.17.1	Bestimmung der Leukozyten- und Eosinophilendichten.....	49
2.17.2	FACS, Bioplex-Assay und ELISA.....	49
2.17.2.1	FACS-Analysen.....	49
2.17.2.2	Bioplex-Assay zum Nachweis unspezifischer Immunglobuline.....	50
2.17.2.3	ELISA zur semiquantitativen Messung von Rheumafaktor und anti-DNA-Antikörpern.....	51
2.18	Allgemeine statistische Auswertung.....	51
3	Ergebnisse.....	52
3.1	Parasitologische Experimente.....	52
3.1.1	Mikrofilarieninjektionen.....	52
3.1.1.1	Mikrofilariämien verschiedener Rückkreuzungsgenerationen.....	52
3.1.1.2	Injektion verschiedener Mikrofilariendosen.....	66
3.1.1.3	Intrapleurale Mikrofilarieninjektion.....	67
3.1.1.4	Vakzinierung durch mehrfache Mikrofilarieninjektionen.....	68
3.1.1.5	Einfluss von Plasma- und Blutübertragung auf die Mikrofilariämie suszeptibler Mäuse.....	70
3.1.1.6	Einfluss der Muttermilch resistenter Mäuse auf die Mikrofilariämie suszeptibler Mäuse.....	72

3.1.2	Natürliche Infektion mit L3.....	73
3.1.2.1	Adultwurmrückfindung und -länge.....	74
3.1.2.2	Mikrofilarieninjektion in nach L3-Infektion nicht patent gewordene resistente und BALB/c-Mäuse.....	75
3.1.3	Implantation von L4 und Mikrofilarieninjektion.....	76
3.1.4	Implantation adulter Männchen und Mikrofilarieninjektion.....	78
3.2	Zelluläre und humorale Parameter.....	79
3.2.1	Leukozyten- und Eosinophilendichte nach L3-Infektion.....	79
3.2.2	FACS-Analysen bei naiven Mäusen, nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion.....	79
3.2.3	Immunglobuline bei naiven Mäusen, nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion.....	83
3.2.4	Autoantikörper und Rheumafaktor nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion.....	85
3.3	Rolle der Lunge beim Mikrofilarienabbau.....	86
3.4	Hauttransplantation zur Überprüfung der MHC-Übereinstimmung kongener Mäuse.....	87
3.5	Genomanalysen.....	88
3.6	Kreuzung <i>mfr</i> -kongener Mäuse mit immundefizienten Inzuchtstämmen.....	92
3.6.1	Nude x BALB/c.DBA/1- <i>mfr</i>	92
3.6.2	SCID x BALB/c.DBA/1- <i>mfr</i>	93
3.6.3	Igα ^{-/-} x BALB/c.DBA/1- <i>mfr</i>	95
3.7	Mikrofilarieninjektion bei verschiedenen Knockout-Mäusestämmen auf resistantem genetischem C57BL/6-Hintergrund.....	96
3.8	Einkreuzung des Suszeptibilitätsallels auf resistenten genetischen DBA/2 Hintergrund.....	97
3.9	Genexpressionsanalysen.....	99
3.9.1	Erste Genexpressionsanalyse.....	99
3.9.1.1	Genexpression bei resistenten Mäusen nach Scheinbehandlung im Vergleich zu naiven Tieren.....	99
3.9.1.2	Genexpression bei resistenten Mäusen nach Mikrofilarieninjektion im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren.....	101
3.9.1.3	Differenzielle Genexpression bei naiven resistenten und BALB/c-Mäusen.....	102

3.9.1.4	Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Scheinbehandlung.....	104
3.9.1.5	Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Mikrofilarieninjektion.....	105
3.9.1.6	Cluster der Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen bei verschiedenen Infektionsstatus.....	106
3.9.1.7	Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Scheinbehandlung.....	108
3.9.1.8	Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Mikrofilarieninjektion.....	109
3.9.2	Zweite Genexpressionsanalyse.....	110
3.9.2.1	Differenzielle Genexpression bei resistenten Mäusen nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion gegenüber alleiniger Mikrofilarieninjektion.....	110
3.9.2.2	Differenzielle Genexpression bei resistenten Mäusen nach Adultweibchenimplantation und Mikrofilarieninjektion gegenüber Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion.....	112
3.9.2.3	Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion.....	114
3.9.2.4	Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Adultweibchenimplantation und Mikrofilarieninjektion.....	116
3.9.2.5	Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Scheinimplantation.....	118
3.9.2.6	Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Adultweibchenimplantation.....	119
4	Diskussion.....	120
4.1	Vererbung der innate Resistenz gegenüber injizierten Mikrofilarien von <i>L. sigmodontis</i> bei Kreuzungen von DBA/1- und BALB/c-Mäusen.....	120
4.2	Der Mikrofilariämieresistenzlocus <i>mfr</i>	122
4.3	Genexpression <i>mfr</i> -kongener Mäuse bei unterschiedlichen Infektionsstatus.....	127
4.4	Beteiligung verschiedener Zelltypen an der innate Resistenz gegen Mikrofilarien.....	134
4.5	Die Rolle von Antikörpern bei der Eliminierung von Mikrofilarien.....	138
4.6	Vakzinierungsexperimente mit Mikrofilarien.....	142

4.7	Rolle der Lunge beim Mikrofilarienabbau.....	143
4.8	Infektion <i>mfr</i> -kongener Mäuse mit anderen Stadien von <i>L. sigmodontis</i>	144
4.9	Mikrofilarieninjektionen in immundefiziente Mäusestämme auf resistantem genetischem Hintergrund.....	148
4.10	Ausblick.....	149

5	Zusammenfassung.....	151
----------	-----------------------------	------------

6	Literaturverzeichnis.....	154
----------	----------------------------------	------------

7	Anhang: Liste der verwendeten Abkürzungen	184
----------	--	------------

1 Einleitung

1.1 Filarien und Filariosen

Filarien (Filarioidea) sind getrenntgeschlechtliche, extraintestinal in Wirbeltieren außer Fischen parasitierende Nematoden, die zu ihrer Entwicklung auf Blut saugende Arthropoden als Zwischenwirte angewiesen sind. In diesen entwickelt sich das erste Larvenstadium, die Mikrofilarie, bis zum für Wirbeltiere infektiösen dritten Larvenstadium. Dieses wird auf den Endwirt übertragen, wo es sich über ein viertes Larvenstadium zum Adultwurm entwickelt. Während Filarien als systematische Gruppe ein recht weites Wirtsspektrum nutzen, sind viele Filarienarten sehr wirtsspezifisch. So kann *Onchocerca volvulus*, der Erreger der Flussblindheit, ebenso wie die Wanderfilarie *Loa loa* außer im Menschen nur in anderen Primaten seinen Entwicklungszyklus durchlaufen, andere Säugetiere sind gegen Infektionen mit diesen Parasiten resistent. Auch innerhalb natürlicher Wirtspopulationen verhalten sich nicht alle Individuen suszeptibel, wofür neben unterschiedlichen Umwelteinflüssen auf die Individuen u. a. genetische Polymorphismen als Ursache angenommen werden können.

Von Infektionen mit Filarien sind mehr als 150 Millionen Menschen vor allem in den Tropen betroffen. Ihre Bedeutung erlangen diese chronischen Erkrankungen im Gegensatz zur Malaria und anderen Tropenkrankheiten nicht durch eine große Zahl von Todesfällen, vielmehr führen sie zu starken Beeinträchtigungen der Lebensqualität und zum Verlust von Arbeitskraft. Aufgrund ihrer schwerwiegenden sozioökonomischen Auswirkungen werden sie von der WHO an dritter Stelle nach Malaria und Tuberkulose als bedeutende Tropenkrankheiten aufgeführt (WHO 2002). Im Wesentlichen haben vier Vertreter der Onchocercinae große Bedeutung als Krankheitserreger des Menschen. Mit *O. volvulus* waren nach Schätzungen der WHO im Jahre 1995 18 Millionen Menschen vor allem im tropischen Afrika infiziert. Mehr als 119 Millionen Menschen sind von lymphatischen Filariosen betroffen (Michael *et al.* 1996). 95 % davon entfallen auf die zirkumtropisch verbreitete *Wuchereria bancrofti* (WHO 1994), fast der gesamte Rest geht auf das Konto der asiatischen *Brugia malayi* und *B. timori*. Sind bei der Onchozerkose Erblindung und verschiedene Hauterkrankungen schwere Krankheitssymptome, so verursachen die anderen Arten Störungen des Lymphgefäß- und des renalen Systems, Schäden durch Entzündungsreaktionen sowie dadurch begünstigte Sekundärinfektionen (Maizels *et al.* 1995).

1.2 Wirtsimmunologie bei Infektionen mit extrazellulären Parasiten

Der Elimination in einen Wirtsorganismus eingedrungener Pathogene liegen zwei grundlegende Prinzipien zu Grunde: eine unspezifische innate Immunantwort und eine nach einem ersten Kontakt aufgebaute adaptive Immunantwort, die spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet ist, wobei beide allerdings eng miteinander verbunden und keineswegs unabhängig voneinander sind. Die angeborene Immunantwort ist der erste Weg zur schnellen Eliminierung eindringender Pathogene (Fearon & Locksley 1996; Robertson 1998; Hoffmann *et al.* 1999). Dabei verhindern Haut- und Schleimhautepithelien bereits das bloße Eindringen von Pathogenen, einerseits als mechanische Barriere, andererseits über die Produktion antimikrobieller Peptide, denen über die unmittelbare mikrobizide Wirkung hinaus weit reichende immunologische Aktivität zukommt (Ganz 2003; Oppenheim *et al.* 2003), so z. B. durch die Anlockung von Leukozyten, die Alarmierung des adaptiven Immunsystems und die Neutralisation proinflammatorischer Pathogenmoleküle (Müller, Autenrieth & Peschel 2005). Für die rasche Vernichtung bereits in den Wirt eingedrungener Bakterien, Pilze und protozoischer Parasiten sind in erster Linie Phagozyten, eosinophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zuständig (Morrissette, Gold & Aderem 1999; Trinchieri 1989; Weller 1997; Rainbird, Macmillan & Meeusen 1998). NK-Zellen setzen über Zytokine, v. a. Interferon (INF-) γ , eine Kaskade von Reaktionen in Gang, die zu einer Immunantwort gegen das infektiöse Agens führt (Trinchieri 1995). Sie selbst erkennen und phagozytieren entsprechende Pathogene bzw. zerstören infizierte Wirtszellen. Verschiedene Phagozyten bewirken eine erste Abwehr gegen Parasiten, z. B. über Stickoxid (Liew, Xu & Chan 1999) und Sauerstoffradikale (Wozencraft, Croft & Slayers 1985; Cardoni *et al.* 1997; Greve *et al.* 1999), wohingegen die von manchen Parasiten gebildeten Enzyme Superoxid-Dismutase und Katalase (Batra, Chatterjee & Srivastava 1990) die Detoxifikation der Sauerstoffradikale ermöglichen und die Parasiten sich dadurch schützen.

Die Erkennung in den Wirtsorganismus eingedrungener Fremdorganismen erfolgt anhand molekularer Muster. Für die innate Immunantwort ist im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort ein sehr schnelles Erkennen von Pathogenen kennzeichnend, was eine Beschränkung auf wenig variable, weit über verschiedene systematische Gruppen verbreitete Muster voraussetzt. Diese Erkennung von pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMP = Pathogen-Associated Molecular Patterns) erfolgt über Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR)

wie z. B. Toll-like-Rezeptoren (TLR), die einer stammesgeschichtlich alten Familie von Rezeptoren angehören, die eine zentrale Rolle für das Immunsystem nicht nur von Säugern, sondern auch von Insekten und Pflanzen spielen (Beutler 2000¹; Beutler 2000²), sowie über C-Typ-Lektine (Hokke & Yazdanbakhsh 2005). TLR sind homolog zu Toll, einem PRR in *Drosophila spp.*, die nur über eine innate Immunantwort verfügen (Tanji & Ip 2005).

PAMP weisen ein hohes Maß an struktureller Ähnlichkeit bei verschiedenen Organismen auf. So gibt es bei Bakterien zwar Unterschiede im O-Antigen-Teil von Lipopolysaccharid (LPS), hingegen weisen alle Gram-negativen Bakterien unveränderlich den gleichen Lipid-A-Teil von LPS auf. Diese Konstanz der PAMP führt dazu, dass zu ihrer Erkennung eine relativ geringe Zahl verschiedener entsprechender Rezeptoren ausreicht. Eine Schlüsselrolle unter den PRR scheint TLR4 innezuhaben. TLR4 sowie TLR2 spielen eine wichtige Rolle bei der durch endosymbiontische *Wolbachia* vermittelten Immunantwort des Menschen gegen *O. volvulus* (Brattig *et al.* 2004). Außer LPS sind auch Lipoproteine, Peptidoglykane und Lipoteichonsäure als PAMP identifiziert worden, die von Bakterien, nicht jedoch von Zellen von Eukaryoten produziert werden. Somit reicht es aus, wenn deren Immunsystem die erwähnten Moleküle anhand der PAMP erkennt, um die Bakterien als Fremdorganismen zu registrieren. Über die PRR werden also nicht verschiedene Pathogene unterschieden. Wie das Immunsystem zwischen pathogenen und kommensalischen Bakterien differenziert, ist noch ungeklärt. Es wird vermutet, dass hierfür antiinflammatorische Zytokine und die Kompartimentierung der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen (Medzhitov 2001). Ein weiterer PRR ist das Mannose Binding Lectin (MBL), das neben dem klassischen und dem alternativen Pathway einen dritten Mechanismus der Komplement-Aktivierung induzieren kann. Das Mannose Binding Lectin erkennt bestimmte Zuckerseitenketten auf der Oberfläche fremder Zellen und Organismen. Derartige Kohlenhydratstrukturen sind auch bei Mikrofilarien mehrfach nachgewiesen worden (Rao *et al.* 1989; Araujo *et al.* 1993). Ob MBL-abhängige Mechanismen der innate Immunantwort auch zum schnellen Abbau von Mikrofilarien von *Litomosoides sigmodontis* in resistenten Labormäusen wie in der vorliegenden Arbeit beitragen oder hierfür gar ursächlich sind, ist allerdings spekulativ.

Bei Parasitosen, die in der Regel chronisch verlaufen, benötigt der Wirt zu ihrer Kontrolle neben den rasch einsetzenden Mechanismen der innate Immunantwort sowohl eine erworbene Antikörper- als auch eine erworbene zellvermittelte Immunantwort (Sher & Coffman 1992). Dabei ist diese zweite, später einsetzende Abwehrreaktion gegen Pathogene, die adaptive Immunantwort, nicht unabhängig von den Vorgängen der innate Immunantwort.

Chemokine und Zytokine, die von Zellen als Reaktion auf Pathogenkontakt gebildet werden, aktivieren nicht nur der innaten Immunantwort zuzurechnende, bereits vorhandene Zellpopulationen, sondern setzen auch je nach Art des Pathogens eine differenzierte adaptive Immunantwort in Gange (Banyer *et al.* 2000). Eine Verbindung zur adaptiven Immunantwort stellt die Komplementkaskade dar. Auch über verschiedene Botenstoffe, wie die Zytokine Interleukin (IL-)6, IL-1 β , Tumornekrosefaktor (TNF-) α und INF- γ , wird eine Aktivierung verschiedener Komponenten des adaptiven Immunsystems bewirkt (Weller 1997; Rainbird *et al.* 1998; Morissette *et al.* 1999).

Die Erkennung von Fremdorganismen läuft bei der adaptiven Immunantwort über andere Wege als bei der innaten Immunantwort. Antigene extrazellulärer Parasiten wie der Filarien werden v. a. von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten prozessiert und durch Bindung an Moleküle des Major Histocompatibility Complex (MHC-) II den CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert. Diese aktivieren über Zytokine unterschiedliche Typen weiterer Zellen. Je nach Art der weiteren Vorgänge spricht man bei diesen CD4⁺-Zellen von T_H1- (T-Helfer-) bzw. T_H2-Zellen (Mosmann *et al.* 1986, basierend auf Parish 1971¹ und 1971²; Parish & Liew 1972; Parish 1973). Typisch für T_H1-Zellen sind u. a. die Sekretion von IL-2, INF- γ und Lymphotoxin α sowie eine starke zelluläre phagozytotische Aktivität (Spellberg & Edwards 2001), während T_H2-Zellen v. a. durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 charakterisiert sind und eine stark antikörperdominierte Immunantwort hervorrufen (Del Prete *et al.* 1994), wobei allerdings keine eindeutige Zuordnung zellulärer T_H1- und humoraler T_H2-typischer Immunantwort möglich ist, da beide sowohl humorale als auch zelluläre Komponenten involvieren. IL-5 steuert die Differenzierung basophiler und eosinophiler Granulozyten (Parsons *et al.* 1993), die u. a. das toxische Major Basic Protein (MBP) freisetzen und am Inflammationsort andere Granulozyten und Mastzellen rekrutieren (Le Goff 2000). INF- γ bewirkt eine Stimulierung von Makrophagen (Szulk & Piasecki 1988), während T_H2-typische Zytokine wie IL-4 und IL-13 im Menschen die Produktion von Immunglobulinen wie IgE und IgG4 fördern.

Ausgelöst wird die Differenzierung von T_H-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen durch dendritische Zellen. Diese werden bspw. durch intrazelluläre Bakterien über TLR stimuliert und reagieren mit der Sekretion von IL-12, was die Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen zu T_H1-Zellen induziert. Treffen dendritische Zellen auf mehrzellige Parasiten, so initiieren sie die Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen zu T_H2-Zellen, hierfür sind aber bislang weder die entsprechenden Rezeptoren noch die verantwortlichen Moleküle sicher bekannt (Lehar & Bevan 2004). Amsen *et al.* (2004) sowie Tanigaki *et al.* (2004) vermuten, dass die

Differenzierung in T_H1- oder T_H2-Zellen über den Notch-Pathway gesteuert wird, einen evolutiv sehr konservierten Signalweg, der die Differenzierung verschiedener Zelltypen beeinflusst. Bei Säugetieren existieren vier Notch-Rezeptoren sowie fünf Notch-Liganden, Jagged 1 und 2 sowie Delta 1, 2 und 3. Die Stimulation dendritischer Zellen mit LPS induziert Delta, wohingegen unter Bedingungen, die zur Ausprägung T_H2-typischer Antworten führen, in dendritischen Zellen Jagged induziert wird. Bindet ein Ligand an einen Notch-Rezeptor, so kann anschließend durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors RBPJ κ die Expression verschiedener Gene, so unter anderem des für das T_H2-typische IL-4 kodierenden Gens, induziert werden. Notch-Liganden scheinen daher an der Polarisierung von T-Zellantworten in Richtung T_H1- oder T_H2-Typ zumindest beteiligt zu sein (Lehar & Bevan 2004).

Bei intestinalen Helminthen wie *Trichuris muris* kontrolliert in der Labormaus eine T_H2-dominierte Antwort den Infektionsverlauf (Else & Grencis 1991), wohingegen bei den extraintestinalen Filarien die Bedeutung einer solchen nicht endgültig geklärt ist. Zwar herrscht bei chronischen Filariosen meist eine T_H2-typische Antwort vor, jedoch ist fraglich, ob diese in der Lage ist, den Parasiten zu kontrollieren, oder ob sie nicht vielmehr vom Parasiten zu dessen eigenem Schutz induziert wird. Einen Hinweis darauf gibt die Beobachtung, dass bei Patienten, die medikamentös von Mikrofilarien befreit wurden, die Immunantwort sich vom T_H2-Typ in Richtung T_H1 verschiebt (Soboslay *et al.* 1992; Soboslay *et al.* 1997). Außerdem beinhaltet die frühe Immunantwort von PBMC (peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) gegen *B. malayi* nur proinflammatorische T_H1-Zytokine wie INF- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-1 α , IL-8, jedoch (noch) keine T_H2-Zytokine (Babu & Nutman 2003). Durch im Tierversuch intraperitoneal injizierte Mikrofilarien wird zunächst eine T_H1-typische Immunantwort mit hoher INF- γ -Produktion induziert, eine anhaltende Mikrofilariämie oder Mehrfachinjektionen von Mikrofilarien führen jedoch zu einer Verschiebung in Richtung T_H2. Adulte weibliche Würmer und dritte Larven induzieren ausschließlich eine T_H2-Antwort (Lawrence 1996).

Bei anderen Helminthen, z. B. *Schistosoma spp.*, Vertretern der Trematoda, induzieren Glykane (Oberflächenzucker) *in vivo* charakteristische innate Wirtsimmunantworten (Hokke & Yazdanbakhsh 2005), die sowohl mit *Schistosoma*-Ei-induzierter T_H1- (MIP-1 β , MIP-2) als auch T_H2-typischer Immunantwort (MIP-1 α , MIP-1 γ u. a.) assoziiert sind (Park *et al.* 2001).

Neben den beschriebenen T_H1- und T_H2-Zell-Populationen rückten in letzter Zeit verstärkt T_H3- oder auch regulatorische T-Zellen in den Mittelpunkt der Forschung, die nach

Stimulierung durch Antigene IL-4, IL-10 und Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) freisetzen können (Levings, Sangregorio & Roncarolo 2001; Maloy & Powrie 2001; Powrie & Maloy 2003). Filarien können sowohl T_H1- als auch T_H2-typische Immunantworten über regulatorische T-Zellen und alternativ aktivierte Makrophagen supprimieren. Für regulatorische T-Zellen ist bei Filarieninfektionen eine Induktion der IgG4-Produktion durch B-Zellen beschrieben (Hoerauf *et al.* 2005). Gillan & Devaney (2005) beobachteten für *B. malayi* eine Regulation bzw. Limitierung der T_H1-Antwort durch T_H2-Zellen, während diese ihrerseits von regulatorischen T-Zellen kontrolliert werden.

Durch Experimente mit Mäusestämmen, die entweder eine T- oder B-Zell-Defizienz oder eine Defizienz beider Zellpopulationen aufwiesen, wurde eine Rolle der B-Zellen sowohl für die innate als auch für die adaptive Immunantwort nachgewiesen. In die Mechanismen, die hierbei zum Abtöten von Wurmlarven führten, sollten u. a. Antikörper, Komplement und Eosinophile involviert sein (Brigandi *et al.* 1996; Rotman *et al.* 1996; Herbert *et al.* 2000). Herbert *et al.* (2002) hingegen konnten für Infektionen mit dem humanpathogenen *Strongyloides stercoralis* eine Rolle von B-Zellen nur bei der adaptiven, nicht jedoch bei der innaten Immunantwort feststellen, wie auch Martin *et al.* (2001) für Infektionen mit L3 von *L. sigmodontis* in der Labormaus eine Bedeutung von B-Zellen nur bei Infektionen mit vorausgehender Vakzinierung mit bestrahlten L3, nicht jedoch bei Erstinfektionen in naiven Tieren erkennen konnten. Insbesondere B1-Zellen produzieren bei einer Zweitinfektion parasitenspezifische Antikörper, v. a. IgM. Herbert *et al.* (2002) rechnen B-Zellen in diesem Modell aber keine Bedeutung für die Polarisierung der Zytokinantwort von T-Zellen oder für die Rekrutierung von Eosinophilen zu, wie dies bei Infektionen mit anderen Parasiten beschrieben wurde.

1.3 Reaktionstypen des Menschen bei Filariosen

In Gebieten, in denen Filariosen endemisch sind, können verschiedene Formen des Krankheitsverlaufes bzw. des Schweregrades der Symptomatik unterschieden werden (WHO 1987). Diese werden auf unterschiedliche immunologische Reaktionen der Wirte gegen die Parasiten zurückgeführt, wobei die Grenzen zwischen diesen Gruppen nicht immer klar zu ziehen sind. Hier vor allem bezogen auf Infektionen mit *O. volvulus*, sind so genannte tolerante, hyporeaktive Patienten mikrofilarienpositiv, zeigen anfangs jedoch keine oder kaum

klinische Symptome. Sie erscheinen immunsupprimiert, reagieren also mit einer für die Kontrolle des Parasiten unzureichenden Immunantwort. Hyperreaktive Patienten hingegen sind zur Eliminierung der Mikrofilarien befähigt, zeigen jedoch aufgrund inadäquater überschießender Immunantworten schwere Pathologien. Mit einer adäquaten Immunantwort Reagierende weisen auch bei längerer Exposition weder nachweisbare Infektionen, noch klinische Symptome auf und werden daher als putativ Immune bezeichnet (Nutman *et al.* 1991).

Da diese unterschiedlichen Verlaufsformen in denselben Endemiegebieten auftreten, können zumindest auch unter anderem genetische Unterschiede innerhalb der menschlichen Population als Ursache für die unterschiedlichen Infektionsverläufe vermutet werden.

1.4 Das Filariose-Tiermodell

Da sich die humanpathogenen Filarien durch eine große Wirtsspezifität auszeichnen, ist man in der Filarioseforschung für bestimmte Fragestellungen auf ein Tiermodell angewiesen. Es sollte verschiedene parasitologische und immunologische Kriterien erfüllen und Faktoren berücksichtigen, die bei Arbeiten im Feld meist unbekannt bleiben. Natürliche Wirtspopulationen sowohl bei human- als auch tierpathogenen Filarien sind nicht nur genetisch sehr uneinheitlich, sondern auch mit Störvariablen behaftet. So ist die Wurmlast des Menschen praktisch nur indirekt über die Mikrofilarien zu bestimmen, der Zeitpunkt der Übertragung kann kaum ermittelt werden, es sind mehrere Entwicklungsstadien der Parasiten gleichzeitig vorhanden, und der Einfluss von Begleitinfektionen mit anderen Parasiten, Bakterien oder Viren ist schlecht abzuschätzen. So erfordert eine genauere Untersuchung einzelner Komponenten des Wirtsimmunsystems, die wiederum gegen einzelne Parasitenstadien gerichtet sind, ebenso wie die Untersuchung der genetischen Grundlagen für Suszeptibilität bzw. Resistenz des Wirtes gegen bestimmte Parasitenstadien bessere Modelle im Labor. Humanpathogene Filarien lassen sich kaum oder nur mit großem Aufwand – unter Einsatz von Primaten – unter Laborbedingungen halten, was jedoch mittlerweile als ethisch fragwürdig gilt. Deshalb bietet sich die Verwendung eines nicht auf Primaten als Wirt spezialisierten nahen Verwandten als geeigneteres Labormodell an. Natürlich lassen sich auch bei humanpathogenen Arten in der Labormaus Infektionen mit einzelnen Parasitenstadien durchführen und die daraus resultierenden Wirtsreaktionen untersuchen (Hoerauf & Fleischer

1997), dies ist jedoch ein sehr artifizielles Vorgehen mit einem verwandtschaftlich sehr weit entfernten Wirt.

Litomosoides sigmodontis ist wie die oben genannten humanpathogenen Filarien ein Vertreter der Onchocercinae. Er beherbergt ebenso wie die bedeutenden humanpathogenen Arten endosymbiotische Wolbachien (Rickettsiales), die für die Pathogenese im Menschen mitverantwortlich gemacht werden (Brattig 2004). Die natürlichen Wirte von *L. sigmodontis* sind verschiedene Baumwollratten (*Sigmodon spp.*), Vertreter der Neuweltmäuse (Sigmodontinae) innerhalb der Mäuseverwandten (Muridae), deren Verbreitungsgebiet sich vom südlichen Nordamerika bis zum nördlichen Südamerika erstreckt (Nowak 1999). Die adulten Würmer halten sich in der Pleura der Baumwollratten auf. Erwachsene Männchen werden rund 3 cm lang, die Weibchen können mehr als das Vierfache davon erreichen. Zur Ernährung ist wenig bekannt, doch ist beschrieben, dass vor allem die jungen Adultweibchen unmittelbar nach der vierten Häutung Erythrozyten als Nahrung aufnehmen (Attout *et al.* 2005). Es sind ovovivipare Tiere, die gescheidete, gut bewegliche Mikrofilarien (Mf) von 55 bis 75 µm Länge abgeben. Die Mikrofilarienscheide ist die Eihülle und umgibt das erste Larvenstadium vollständig. Die Mikrofilarien wandern in die Blutbahn ein, von wo sie von ihrem Vektor, der Tropischen Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti* (Mesostigmata: Macronyssidae), beim Stich aufgenommen werden. Sie penetrieren das Darmepithel und entwickeln sich im Laufe von zehn Tagen nach der Aufnahme bis zum dritten Larvenstadium (L3), welches bei einem weiteren Stich wiederum auf eine Baumwollratte übertragen wird. Die L3 gelangen über Lymph- und Blutgefäße in die Lunge, von wo aus sie sich in die Pleurahöhle einbohren (Wenk 1967), in der sie sich nach sechs bis acht Wochen über ein viertes Larvenstadium (L4) zu Adultwürmern häuten. 55 bis 60 Tage nach dem Eindringen der L3 in den Wirt beginnt die Patenz (Le Goff *et al.* 2002).

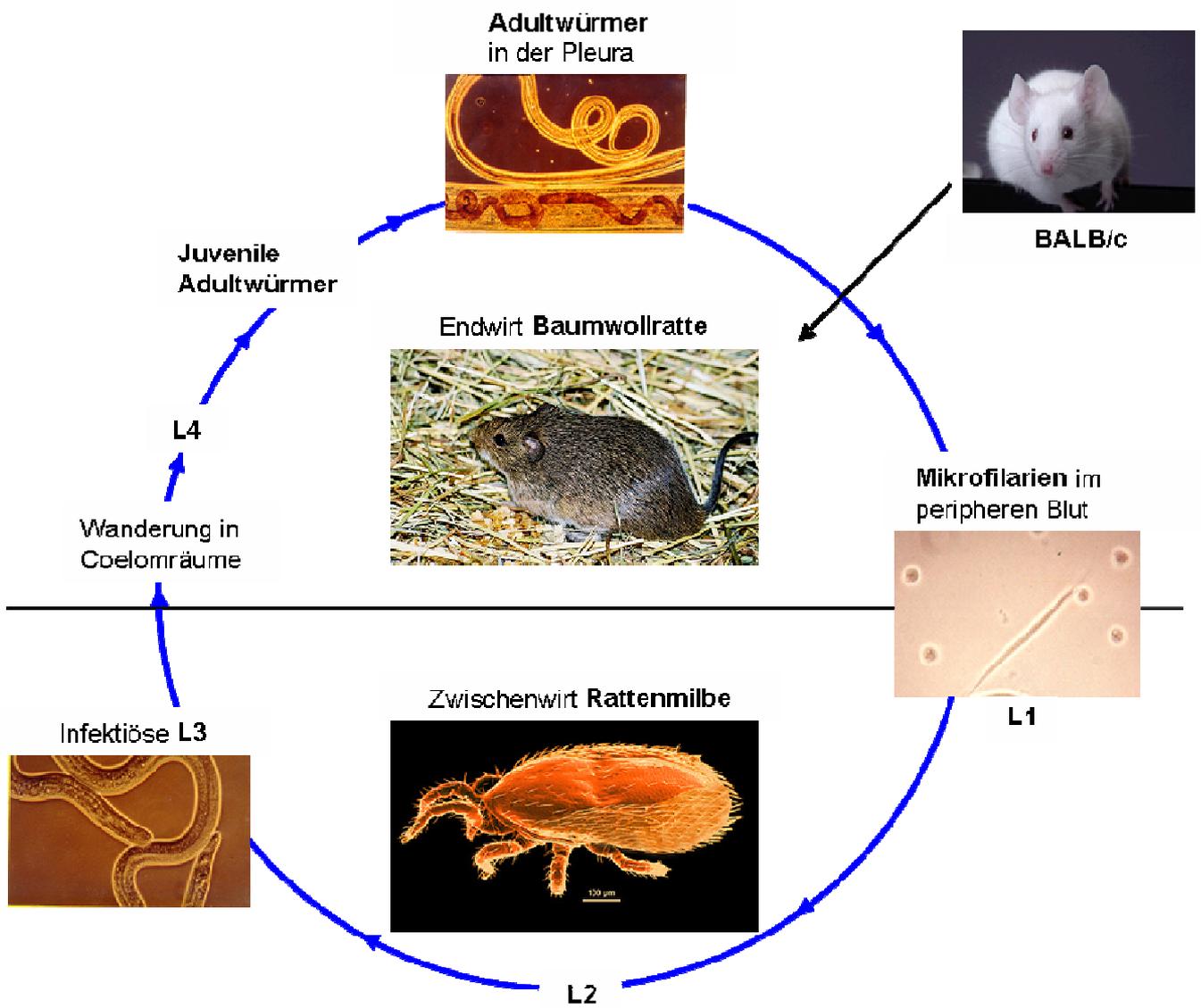


Abb. 1.1: Entwicklungszyklus von *Litomosoides sigmodontis*.

1.4.1 *Litomosoides sigmodontis* im Labor

L. sigmodontis lässt sich unter Laborbedingungen außer in Baumwollratten auch gut in Mongolischen Rennmäusen (*Meriones unguiculatus*), Vertretern der Gerbillinae, halten. Als Vektor dient auch hier *O. bacoti*. Mit Baumwollratten und Rennmäusen lassen sich allerdings kaum immunologische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen durchführen, es stehen auch keine Inzuchtstämme mit definierten, unterschiedlichen Phänotypen hinsichtlich des Verlaufs einer Infektion mit *L. sigmodontis* zur Verfügung. Ihre Genome sind noch nicht sequenziert, was einen Vergleich verschieden suszeptibler Tiere einer Auszuchtpopulation auf Genomebene sehr erschwert. Demgegenüber bieten Labormäuse viele Vorteile: es steht eine Vielzahl an Reagenzien und Antikörpern zur Verfügung, moderne Genexpressions-microarrays decken inzwischen das gesamte Genom ab und ermöglichen so die gleichzeitige Analyse der Expression aller bekannter Gene. Es existieren mehrere hundert Inzuchtstämme, die teils sehr unterschiedlich auf eine *L. sigmodontis*-Infektion reagieren. Das Mausgenom ist anhand mehrerer Inzuchtstämme bereits sequenziert, für viele Inzuchtstämme stehen erprobte Sets von Mikrosatellitenmarkern zur Verfügung, die einen Vergleich der Genome verschiedener Mäusestämme ermöglichen. Im Allgemeinen sind immunkompetente Inzuchtstämme von Labormäusen resistent gegen Infektionen mit *L. sigmodontis*, seien es „natürliche“ Infektionen mit dem dritten Larvenstadium, oder auch artifizielle Infektionen mit anderen Entwicklungsstadien. Einen suszeptiblen Phänotyp zeigen jedoch verschiedene Inzuchtstämme aus der BALB-Linie. Insbesondere in BALB/c kann *L. sigmodontis* nach Infektion mit dem dritten Larvenstadium in etwa 50 % der infizierten Tiere eine vollständige Entwicklung durchlaufen (Petit *et al.* 1992).

Aus Baumwollratten und Rennmäusen lassen sich die verschiedenen Entwicklungsstadien von *L. sigmodontis* problemlos isolieren, was an Labormäusen die Untersuchung von Wirtsreaktionen ermöglicht, die spezifisch für bestimmte Parasitenstadien sind. Bei einer natürlichen Infektion kommen teilweise gegensätzliche Auswirkungen verschiedener Parasitenstadien auf den Wirt zum Tragen. Sind Mikrofilarien und adulte Würmer gleichzeitig vorhanden, so dominiert bei chronischer Infektion eine T_H2-Immunantwort, der Einfluss der Mikrofilarien auf den Wirt wird hierbei überdeckt (Lawrence 1996). Besondere Bedeutung haben Untersuchungen zur Immunantwort gegen Mikrofilarien alleine. Gray & Lawrence (2002) sehen das Verständnis der zum Abtöten der Mikrofilarien von *L. sigmodontis* führenden immunologischen Vorgänge im Wirt sowohl in Hinblick auf einen möglichen

Angriffspunkt zur Unterbindung der Übertragung, als auch auf die durch absterbende Mikrofilarien verursachte Pathologie bei Infektionen mit nahe verwandten Arten wie *O. volvulus* als wesentlich an.

1.4.2 Die Haus- bzw. Labormaus

1.4.2.1 Systematik

Hausmäuse (*Mus musculus*) gehören zur umfangreichsten der 26 Säugetierordnungen, den Nagetieren (Rodentia), Unterordnung Myomorpha. Darin stehen sie in der gattungs- und artenreichsten Familie der Mäuseverwandten (Muridae) und der Unterfamilie der Eigentlichen Mäuse (Murinae). 1943 listeten Schwarz & Schwarz 11 Unterarten auf, je nach Autoren werden sie teilweise auch nur als Stämme (Wilson & Reeder 1993) oder als eigene Arten betrachtet (Milishnikov, Lavrenchenko & Lebedev 2004). Vier Unterarten spielten für die Entwicklung der heutigen Labormäuse eine Rolle: *M. m. musculus* aus Asien, Zentral- und Osteuropa, *M. m. castaneus* aus Süd- und Ostasien, *M. m. domesticus* aus West- und Südeuropa sowie aus Japan *M. m. molossinus*, die ihren Ursprung in den erstgenannten Unterarten haben soll (Bonhomme *et al.* 1989).

1.4.2.2 Die Hausmaus als Haus- und Labortier

Die Haltung und Zucht von Hausmäusen hat eine teilweise mehr als 3000 Jahre lange Tradition. In chinesischen Schriften um 1100 v. Chr. finden sich bereits Beschreibungen gefleckter Mäuse, aus Europa existieren Berichte über die Vererbung von Fellfarben aus dem 18. Jahrhundert (Belle 2004). Die früheste Aufzeichnung über wissenschaftliche Versuche an Hausmäusen stammt aus dem Jahre 1664 von Robert Hooke. Die heutigen Labormäuse haben ihren Ursprung großteils in Zuchten zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Im Jahr 1900 begann Abbie Lathrop in den USA eine Hausmauszucht, die zunächst auf die Zucht von Mäusen als Haustiere für Liebhaber ausgelegt war. Ihre Mäuse fanden aber auch bald Eingang in die wissenschaftliche Forschung. Ein weiterer Grundstein für die Entwicklung der Labormaus war in den Jahren 1908 die Gründung des Bussey Instituts in Harvard durch William Castle,

wo früh bedeutende genetische Forschung betrieben wurde. Castle selbst veröffentlichte bereits 1903 seine Ergebnisse zur Vererbung des Albinismus (Snell & Reed 1993). Einer der Schüler Castles, Clarence Cook Little, begann 1909 mit der Entwicklung des ersten Inzuchtmäusestammes und gründete 20 Jahre später das Jackson Laboratory, das neben der Firma Charles River heute den größten Bestand an Labormäusen besitzt. 1937 entdeckte Peter Gorer an Mäusen den Einfluss des *H-2-Locus*, später als MHC (Major Histocompatibility Complex) beschrieben, bei der Abstoßung von Hauttransplantaten. Ende der 1940er Jahre entwickelte George Snell MHC-kongene Mäusestämme, die bis auf den *H-2-Locus* genetisch völlig identisch sind, was der immunologischen Forschung neue Möglichkeiten erschloss und Snell einen Nobelpreis einbrachte (Pennisi 2000). Die vier o. g. Unterarten von *M. musculus* trugen genetisch zu unterschiedlichen Teilen zur Entwicklung der heutigen Labormäuse bei. Der Hauptanteil des Genoms stammt dabei von *M. m. musculus*.

1.4.2.3 Inzuchtstämme, kongene Stämme, Knockoutmutationen

Als Inzuchtstämme werden solche Zuchtlinien bezeichnet, die entsprechend den Regeln des Committee On Standardized Genetic Nomenclature For Mice (1989) mindestens 20 Generationen ausschließlich durch Bruder-Schwester-Paarungen, basierend auf nur einem Zuchtpaar je Generation, gezüchtet wurden. Nach dieser Generationenfolge werden die Tiere als an allen genetischen Loci homozygot, also genetisch identisch betrachtet, auch wenn rechnerisch erst 98.7 % aller Loci homozygot vorliegen (Green 1981). Vollkommene Homozygotie ist tatsächlich nie zu erreichen, und auch extrachromosomale Faktoren spielen hierbei eine Rolle (Heinecke 1989). Es können außerdem auch noch neue Spontanmutationen auftreten. Bereits innerhalb der Populationen der verschiedenen Unterarten von *M. musculus* besteht ein hoher Grad an genetischer Heterogenität, wie dies Yu & Peng 2002 für *M. m. castaneus* nachwies. Da die einzelnen Inzuchtstämme zu sehr unterschiedlich großen Anteilen auf den o. g. vier Unterarten basieren, demnach die Ausgangspopulationen in den frühen Zuchten ebenfalls sehr heterogen gewesen sein dürften und die heutigen Inzuchtstämme durch teilweise mehrere hundert Zuchtgenerationen genetisch separiert sind, können verschiedene Inzuchtstämme als Repräsentanten einzelner Genotypen einer natürlichen Population angesehen werden. Aufgrund der relativ kleinen Gründerpopulationen sind die genetischen Unterschiede zwischen den klassischen Inzuchtstämmen allerdings geringer als zwischen direkt auf Wildtieren basierenden Inzuchtstämmen. Die ersten

Inzuchtmäusestämme datieren zurück bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts. Zu den ältesten Inzuchtstämmen, die sich deshalb genetisch auch am stärksten voneinander unterscheiden, zählen DBA, BALB und C57BL.

Durch die Kreuzung zweier Inzuchtstämmen und Rückkreuzung der Nachkommen mit dem Rezipientenstamm unter Selektion auf ein Merkmal des Donorstammes können Mäuse erzielt werden, die genetisch bis auf die Zielregion mit dem Rezipientenstamm übereinstimmen (Markel *et al.* 1997). Man spricht bereits nach zehn Generationen serieller Rückkreuzung von kongenen Tieren, auch wenn der neue Stamm dann rechnerisch noch in etwa 1 % des Donorgenoms vom Rezipientenstamm abweicht. Eine Koisogenität, d. h. eine genetische Übereinstimmung zweier Mäusestämme bis auf tatsächlich nur ein einziges Gen kann nur durch Mutation innerhalb eines Inzuchtstammes erreicht werden, da bei der Einkreuzung eines gewünschten Merkmals stets ein etwas größeres Chromosomensegment als nur das Zielgen übertragen wird, d. h. es besteht hier immer eine gewisse genetische Kontamination. Die Länge des weiter übertragenen differenziellen Chromosomensegments in Centimorgan berechnet sich bei mehr als fünf Rückkreuzungen vereinfacht als $200/\text{Anzahl der Rückkreuzungen}$, d. h. nach zehn Generationen ist damit zu rechnen, dass der vom Donor stammende Chromosomenabschnitt, der das selektierte Gen enthält, inklusive flankierender Bereiche noch 20 cM umfasst. Darüber hinaus werden auch an anderen Stellen des Genoms der kongenen Tiere noch zufällig verteilte, nicht mit dem selektierten Gen gekoppelte „Passenger Loci“ des Donorstammes zu finden sein, deren Anzahl mit zunehmender Anzahl der Rückkreuzungen abnimmt (Silver 1995). Die zunehmende Übereinstimmung im Aufbau befindlicher kongener Mäusestämme verdeutlicht Abbildung 1.2 am Beispiel der Kreuzung von BALB/c und DBA/1 und Rückkreuzung der Nachkommen mit BALB/c.

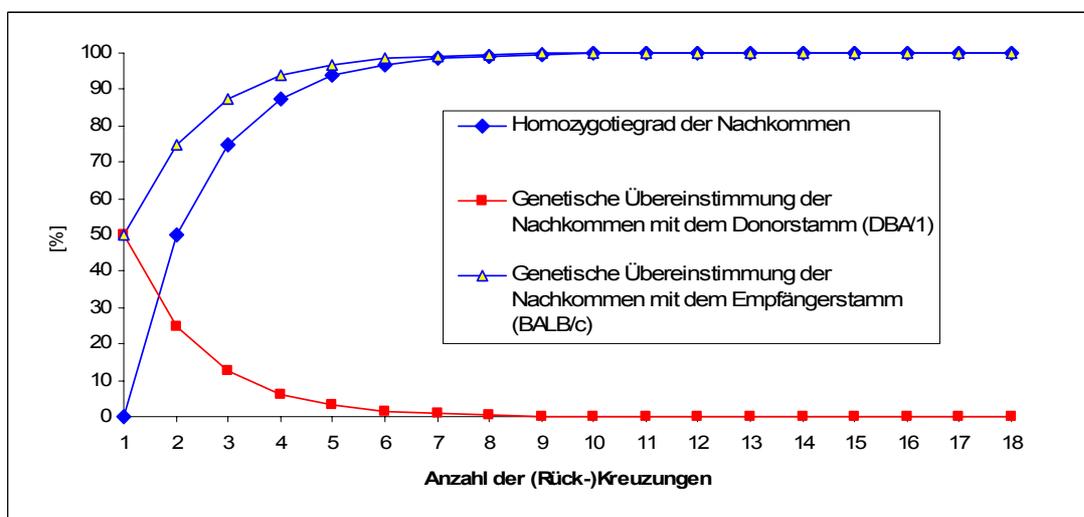


Abb. 1.2: Zunahme des Homozygotiegrades verschiedener (Rückkreuzungs-)Generationen, ausgehend von den Parentalstämmen DBA/1 und BALB/c bis zu kongenen Mäusen.

1.5 Vererbung von Resistenzen gegen verschiedene Pathogene

Speziell die innate Resistenz von Labormäusen gegen intrazelluläre Pathogene wie *Mycobacterium bovis*, *Salmonella typhimurium* und *Leishmania donovani* wird von einem einzigen dominant autosomal vererbten Gen *Slc11a1* (solute carrier family 11a member 1) vermittelt (Denis *et al.* 1986; Skamene *et al.* 1982). Das Gen wurde auch als *Nramp1* (natural resistance associated macrophage protein), *Lsh*, *Bcg* oder *Ity* beschrieben (Gros, Skamene & Forget 1981; Blackwell 2001). Xu *et al.* (1996) kreuzten resistente DBA/2- (*Bcg^f*) und suszeptible C57BL/6-Mäuse (*Bcg^s*) und erzielten nach 20 Generationen Rückkreuzung mit C57BL/6 bei Selektion der Nachkommen auf Resistenz *Bcg*-kongene Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund, die einen Infektionsverlauf entsprechend DBA/2 aufwiesen.

Die Resistenz von Labormäusen gegen *L. major* wird hingegen multigen vermittelt. Beebe *et al.* (1997) verwendeten für ihre Untersuchungen resistente B10.D2- und suszeptible BALB/c-Mäuse. Nach Kreuzung beider Stämme und fünf Generationen der Rückkreuzung resistenter Nachkommen mit BALB/c ermittelten sie aufgrund einer großen Häufigkeit von Polymorphismen in den entsprechenden Genloci für die Resistenz verantwortliche Gene auf den Chromosomen 6, 7, 10, 11, 15 und 16.

Auch bei experimentellen Helmintheninfektionen unterscheiden sich verschiedene Nagetierstämme in ihrer Suszeptibilität, z. B. gegenüber *S. mansoni* (Deelder, Class & De Vries 1978; Colley & Freeman 1980), *Nematospiroides dubius* (Si-Kwang 1966), *Strongyloides ratti* (Dawkins *et al.* 1980) sowie *B. pahangi* und *Acanthocheilonema viteae* (Fox & Schacher 1976; Haque *et al.* 1980). Resistenz vermittelnde Genloci konnten bei den Wirten aber nicht genauer ermittelt werden, da die Versuchstiere genetisch nicht sehr homogen und schlecht charakterisiert waren (Fanning & Kazura 1983). Fanning & Kazura untersuchten aber ihrerseits die genetischen Grundlagen der Resistenz oder Empfänglichkeit verschiedener Labormausstämme gegenüber *B. malayi*. Inzuchtstämme wie CBA, C3H und DBA/1 zeigten niedrigere und wesentlich kürzer andauernde Mikrofilariämien als C57BL/6, BALB/c u. a. Es wurde eine Unabhängigkeit vom MHC-II-Komplex festgestellt. So unterschieden sich Stämme mit demselben MHC-Haplotyp, aber unterschiedlichem genetischen Hintergrund, wie CBA und C57Br mit *H-2^k* bzw. A.Sw und SJL mit *H-2^s*

erheblich in der Anzahl von Parasiten im Blut und deren Zirkulationsdauer, während sich kongene Stämme, d. h. mit gleichem genetischen Hintergrund, aber unterschiedlichem MHC, wie C3H.B10 ($H-2^b$) und C3H/HeJ ($H-2^k$) diesbezüglich nicht unterschieden. Die Kreuzung von suszeptiblen DBA/2- mit resistenten C3H-Mäusen brachte in der ersten Filialgeneration stets nur resistente Nachkommen hervor (d. h. Tiere, in deren Blut nach vier bis sechs Tagen keine Mikrofilarien nachweisbar waren). Wurde die F1 mit dem parental Stamm C3H rückgekreuzt, so war die N2 resistent, die Rückkreuzung mit DBA/2 brachte sowohl resistente als auch empfängliche N2-Tiere hervor. Dies spricht in diesem Fall für eine dominante Vererbung der Resistenz gegenüber der Empfänglichkeit und für nur ein einzelnes oder wenige verantwortliche Gene. Die Grundidee, kongene Mausstämmen zur Ermittlung multi- wie monogener Ursachen unter anderem der Resistenz gegen Pathogene zu verwenden, geht weit zurück bis auf Fisher (1965) oder gar Bartlett & Haldane (1935), wurde aber wegen des hohen zeitlichen wie logistischen Aufwandes nur sporadisch eingesetzt (Brownstein *et al.* 1992).

Beim Menschen ist ein Genlocus (5q31-q33) beschrieben, der für die Kontrolle von *S. mansoni*-Infektionen verantwortlich ist, für *Ascaris lumbricoides*-Infektionen fand man entsprechende Loci auf den Chromosomen 1 und 13 (Quinnell 2003). Für Filariosen gibt es bislang jedoch noch keine sichere Assoziation von genetischen Faktoren mit den Infektionsverläufen.

1.6 Genetische Grundlagen der Resistenz von Labormäusen gegen *L. sigmodontis*

Verschiedene Labormausstämmen zeigen unterschiedliche Reaktionen auf injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis*. So können DBA/1-Mäuse diese innerhalb von zwei Tagen komplett aus dem Blut eliminieren, während sie bei BALB/c-Mäusen über einen Monat lang zirkulieren können. Auch andere Mäusestämmen, in deren Blut innerhalb von vier Tagen *post infectionem* keine Mikrofilarien mehr nachweisbar sind, werden von uns entsprechend per Definition als resistent, solche mit längerer Mikrofilariämie als suszeptibel bezeichnet. MHC-II-Knockout-Mäuse auf ebenfalls resistentem C57BL/6-Hintergrund tolerieren injizierte Mikrofilarien über einen langen Zeitraum, was die Hypothese nahe legt, dass immunologische

Faktoren an der Eliminierung von Mikrofilarien beteiligt sind. Allerdings sind C57BL/10-Mäuse mit dem MHC-Haplotyp $H-2^d$ des suszeptiblen Stammes BALB/c ebenso resistent wie C57BL/6 mit dem MHC-Haplotyp $H-2^b$, gleiches gilt für DBA/2- ($H-2^d$) im Vergleich zu DBA/1-Mäusen ($H-2^q$), so dass dies zumindest für die unterschiedliche innate Immunantwort von resistenten und suszeptiblen Mäusen wie auch in den Versuchen von Fanning & Kazura (1983) nicht von Bedeutung zu sein scheint (Hoffmann *et al.* 2001). Auch Knockouts der Gene für IL-4 sowie IL-10 auf resistentem C57BL/6-Hintergrund sowie des Gens für INF- γ auf resistentem DBA/1-Hintergrund führen nicht zu einer Änderung des Phänotyps bei intravenöser Injektion von *L. sigmodontis*-Mikrofilarien (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Erste Kreuzungsversuche von Bereth (2000) mit DBA/1- und BALB/c-Mäusen sprachen für eine monogene, dominante Vererbung der Resistenz gegenüber injizierten Mikrofilarien von *L. sigmodontis*.

Das breite Reaktionsspektrum verschiedener Labormausstämme bei Infektionen mit *L. sigmodontis* macht eine Eignung des Filariose-Tiermodells auch zur Aufschlüsselung des vielfältigen Reaktionsspektrums in humanen Populationen vorstellbar. Die Unterschiede zwischen verschiedenen Mäusestämmen in Laborversuchen repräsentieren dann in vereinfachter Form die Unterschiede zwischen den Individuen einer natürlichen Population, wobei zu beachten ist, dass sämtliche Inzuchtstämme genetisch sicherlich weniger differieren als verschiedene Individuen einer einzigen natürlichen Population. Diese Vereinfachung ermöglicht es aber, die Bedeutung einzelner Wirtsgene auf Infektionsverläufe zu untersuchen, da mittels der oben erwähnten Rückkreuzungsstrategie zur Erzielung kongener Mäuse ein Einfluss des sonstigen genetischen Hintergrundes ausgeschlossen oder minimiert werden kann.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für die vorliegende Arbeit sollten zunächst Mäuse gezüchtet werden, die gegen intravenös injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis* resistent, dabei aber kongen zu suszeptiblen Inzuchttieren sind. In früheren Arbeiten war für den Inzuchtstamm BALB/c ein suszeptibler, für den Inzuchtstamm DBA/1 ein resistenter Phänotyp beschrieben worden, außerdem ließen erste Kreuzungsexperimente auf einen monogenen Erbgang mit Dominanz des Resistenz vermittelnden Allels schließen. Unter „resistent“ wird hier verstanden, dass innerhalb von vier Tagen keine Mikrofilarien mehr im peripheren Blut nachweisbar sind, d. h. dieser Form der Resistenz müssen Mechanismen zugrunde liegen, die der frühen, innaten Immunantwort zuzurechnen sind.

Anhand der aus den hier beschriebenen Kreuzungsexperimenten mit BALB/c und DBA/1 hervorgegangenen zweiten Rückkreuzungsgeneration sollte durch Mikrosatellitenanalysen versucht werden, zunächst genomweit auf DNA-Ebene diejenigen Bereiche zu ermitteln, in denen sich resistente und suszeptible Tiere unterscheiden, bzw. sollten Marker gefunden werden, für die sich eine signifikante Kopplung mit dem resistenten Phänotyp ergab. Die weitere Untersuchung der sich daraus ergebenden Kandidatenregion(en) sollte dann an den kongenen Tieren höherer Rückkreuzungsgenerationen erfolgen. Hierdurch sollte also ein für die Ausprägung von Resistenz oder Suszeptibilität gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* in der Labormaus verantwortlicher Genlocus definiert werden. Darüber hinaus war von Interesse, ob neben dem postulierten „Hauptresistenzlocus“ *mfr* (**m**icro**f**ilaraemia **r**esistance) nicht doch weitere, evtl. auch geschlechtschromosomale Genloci modulierend an der Ausprägung des resistenten Phänotyps beteiligt sind. Da für viele verschiedene Parasitenarten, sowohl Protozoen wie auch Metazoen, geschlechtsspezifische Unterschiede in der Suszeptibilität der Wirte beschrieben sind (Klein 2004), sollte durch entsprechende Kreuzungsstrategien ein solcher Einfluss ausgeschlossen werden. Durch Hauttransplantationen sollte auch die MHC-Übereinstimmung der kongenen Tiere nachgewiesen werden, um frühere Versuche, die für die innate Immunantwort eine Unabhängigkeit des Phänotyps vom MHC-Haplotyp in diesem Modell ergaben, zu bestätigen. Außer der Beschreibung der genetischen Grundlagen der Resistenz war auch die Darstellung der sich auf RNA-Ebene abspielenden Vorgänge durch Genexpressionsanalysen mit cDNA-Microarrays an den kongenen Mäusen bei unterschiedlichem Infektionsstatus ein Ziel, einerseits um die sich prinzipiell abspielenden Vorgänge überhaupt darzustellen, andererseits

war auch denkbar, dass die sich aus den Mikrosatellitenanalysen ergebenden Kandidatengene auch in den Genexpressionsanalysen als differenziell reguliert wieder zu finden waren.

Während die adaptive Immunantwort gegen Filarien im Tiermodell sowie bei Infektionen im Menschen recht gut charakterisiert ist, gibt es nur wenige Publikationen zur innate Resistenz bei murinen Filariosen. Le Goff *et al.* (2000) konnten bei ihren Untersuchungen einen Einfluss von IL-5 nur auf die adaptive, nicht jedoch auf die innate Immunantwort zeigen. Aus den Untersuchungen von Pfaff *et al.* (2000)¹ geht hervor, dass Stickoxid zwar *in vitro* mikrofilarizid wirkt, *in vivo* dies jedoch nicht gilt. Informationen zu den an der innate Resistenz gegen Filarien beteiligten Substanzen sind daher noch dürftig und vage, ebenso zu den daran konkret beteiligten Zelltypen. Korten *et al.* (2002) beschrieben die Rolle von NK-Zellen für die innate Immunantwort bei *L. sigmodontis*, Simons, Rothenberg & Lawrence (2005) zeigten die Bedeutung von Eosinophilen für die innate Immunantwort gegen *B. malayi* in der Labormaus.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher über FACS-Analysen des peripheren Blutes naiver und mit Mikrofilarien infizierter, resistenter wie suszeptibler Mäuse mögliche zelluläre Unterschiede zwischen den kongenen Mäusestämmen untersucht werden, die einen Rückschluss auf die an der Vermittlung von Resistenz und Suszeptibilität beteiligten Zelltypen ermöglichen könnten. Humorale Parameter (polyklonale Immunglobuline sowie Autoantikörper und Rheumafaktor) im peripheren Blut sollten mittels Bioplex-Assay sowie ELISA gemessen werden.

Eine mögliche humorale Grundlage der innate Resistenz sollte auch durch verschiedene Experimente zur Übertragbarkeit von Resistenzfaktoren über Blut oder Plasma von naiven oder infizierten resistenten Mäusen auf suszeptible Tiere untersucht werden, ebenso ob die Verabreichung von Muttermilch resistenter Tiere an suszeptible Jungtiere einen Einfluss auf den Verlauf einer späteren Mikrofilarieninfektion hat.

Um einen eventuellen Einfluss des für die innate Immunantwort definierten Mikrofilariämieresistenzlocus auch auf die adaptive Immunantwort zu erfassen, sollten verschiedene Vakzinierungsexperimente mit mehrfachen Mikrofilarieninjektionen in verschiedenen Abständen bei resistenten und suszeptiblen kongenen Mäusen durchgeführt werden.

Mit diesen Mäusen sollten schließlich auch Infektionsversuche mit anderen Parasitenstadien durchgeführt werden, um einen möglichen Einfluss des postulierten Mikrofilariämie-resistenzlocus auch hier und damit möglicherweise doch auch für einen natürlichen Infektionsverlauf aufzuzeigen. Aus früheren Versuchen (Hoffmann *et al.* 2001; Schumacher 2002) war bekannt, dass adulte Weibchen von *L. sigmodontis* in der Lage sind, in genotypisch resistenten Mäusen den Abbau intravenös injizierter Mikrofilarien stark zu verzögern und diese somit suszeptibel werden zu lassen, und dass andererseits in den gleichen Mäusen adulte Männchen zu einer extremen Beschleunigung des Mikrofilarienabbaus und somit sozusagen zu „superresistenten“ Mäusen führen. Der Einfluss adulter Männchen auf die Mikrofilariämiedauer sollte daher hier nochmals mit resistenten Tieren höherer Rückkreuzungsgenerationen bestätigt werden, außerdem sollte die Genexpression nach Adultweibchenimplantation in Verbindung mit Mikrofilarieninjektion gemessen und auf mögliche entgegen gesetzte Regulation gegenüber alleiniger Mikrofilarieninjektion untersucht werden. Weitere Infektionsexperimente mit L3 und L4 sollten einmal direkt die Weiterentwicklung dieser Stadien in den verschiedenen Mäusestämmen erfassen, aber auch wie bei den Adultwurmimplantationen Erkenntnisse liefern, inwieweit diese Parasitenstadien Einfluss nehmen auf eine spätere Mikrofilarieninjektion und somit auf die adaptive Immunantwort, und inwiefern der *mfr* auch hier eine Rolle für den Infektionsverlauf spielt.

Mikrofilarieninjektionen an verschiedenen Mäusestämmen auf resistentem genetischen Hintergrund mit Knockouts verschiedener immunologisch relevanter Gene sowie an verschiedenen Mäusestämmen mit sonstigen Immundefizienzen und Kreuzungen dieser Stämme mit kongenen resistenten Tiere sollten schließlich Rückschlüsse auf die Beteiligung z. B. verschiedener Zytokine oder bestimmter Zelltypen an der Vermittlung der Resistenz zulassen.

Letztlich sollten diese Untersuchungen auf eine Etablierung des vorgestellten Filariose-Tiermodells als Pioniermodell für die innate Immunantwort gegen große, nicht phagozytierbare Pathogene hinführen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Labormausstämme

Als Versuchstiere wurden zunächst Mäuse der Inzuchtstämme BALB/cOlaHsd und DBA/1OlaHsd, im Folgenden als BALB/c und DBA/1 bezeichnet, verwendet. Mit diesen Stämmen wurden Kreuzungen und Rückkreuzungen durchgeführt und schließlich ein darauf basierender, zu BALB/c kongener Stammes gezüchtet. BALB/c und DBA/1 kamen ursprünglich von Harlan-Winkelmann (Borchen) und wurden am Institut für Tropenmedizin weitergezüchtet. Die Züchtung des zu BALB/c kongenen Stammes, der sich von diesem nur durch seine Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis* unterscheidet (BALB/c.DBA/1-*mfr*, d. h. auf den genetischen Hintergrund des Rezipientenstammes BALB/c wurde das Resistenz vermittelnde Allel des Donorstammes DBA/1 für den Mikrofilariämieresistenzlocus *mfr* übertragen), wurde folgendermaßen durchgeführt:

Die Kreuzung eines BALB/c-Männchens mit einem DBA/1-Weibchen ergab die erste Filialgeneration (F1 = N1). Ein Weibchen dieser Generation wurde mit dem BALB/c-Elterntier rückgekreuzt. Die daraus folgenden N2-Nachkommen wurden auf ihre Empfänglichkeit für Mikrofilarien von *L. sigmodontis* überprüft und ein resistentes Weibchen mit einem BALB/c-Männchen rückgekreuzt. Dies wurde zunächst bis zur N7 wiederholt. Tiere der N7, die als resistent betrachtet wurden, wurden untereinander verpaart. Die resultierenden resistenten N7F1 (sowohl Weibchen als auch Männchen) wurden mit BALB/c rückgekreuzt, um auf Homo- bzw. Heterozygotie dieser Tiere bzgl. der Resistenz gegen Mikrofilarien schließen zu können. Mäuse, die hierbei nur resistente N7F1N1-Nachkommen produzierten, wurden als homozygot resistent betrachtet und untereinander weiterverpaart. Mit diesem homozygoten Stamm wurden dann bereits verschiedene Versuche durchgeführt, gleichzeitig wurde dieser Stamm aber ausgehend von der N7F4 auch weiter mit BALB/c rückgekreuzt, um den Anteil DBA/1-Genom weiter zu verringern und zu BALB/c tatsächlich kongene Mäuse zu erzielen. Dies wurde bis zur N7F4N7 weitergeführt, dann folgten wieder eine Inzuchtgeneration sowie eine anschließende Rückkreuzung, um wiederum die homozygoten Tiere selektieren und weiter inzüchten zu können. Mit den ebenfalls anfallenden suszeptiblen Mäusen der N7F4N7F1 wurde ein homozygot empfänglicher Mäusestamm begründet.

Um die Benennung der Generationen zu vereinfachen, werden in den folgenden Kapiteln Tiere ab N7F4N7Fx mit N14FxNy bezeichnet, also z. B. N14F1N1 statt N7F4N7F1N1, bzw.

darüber hinausgehende Rückkreuzungen nur noch mit N16, N17 usw.; die Rückkreuzungsschemata sind in den Abbildungen 2.1 und 2.2 dargestellt. Angegeben sind darin die jeweils erwarteten Aufspaltungsverhältnisse resistenter und suszeptibler Tiere jeder Generation, wenn ein dominanter, monogener Erbgang angenommen wird.

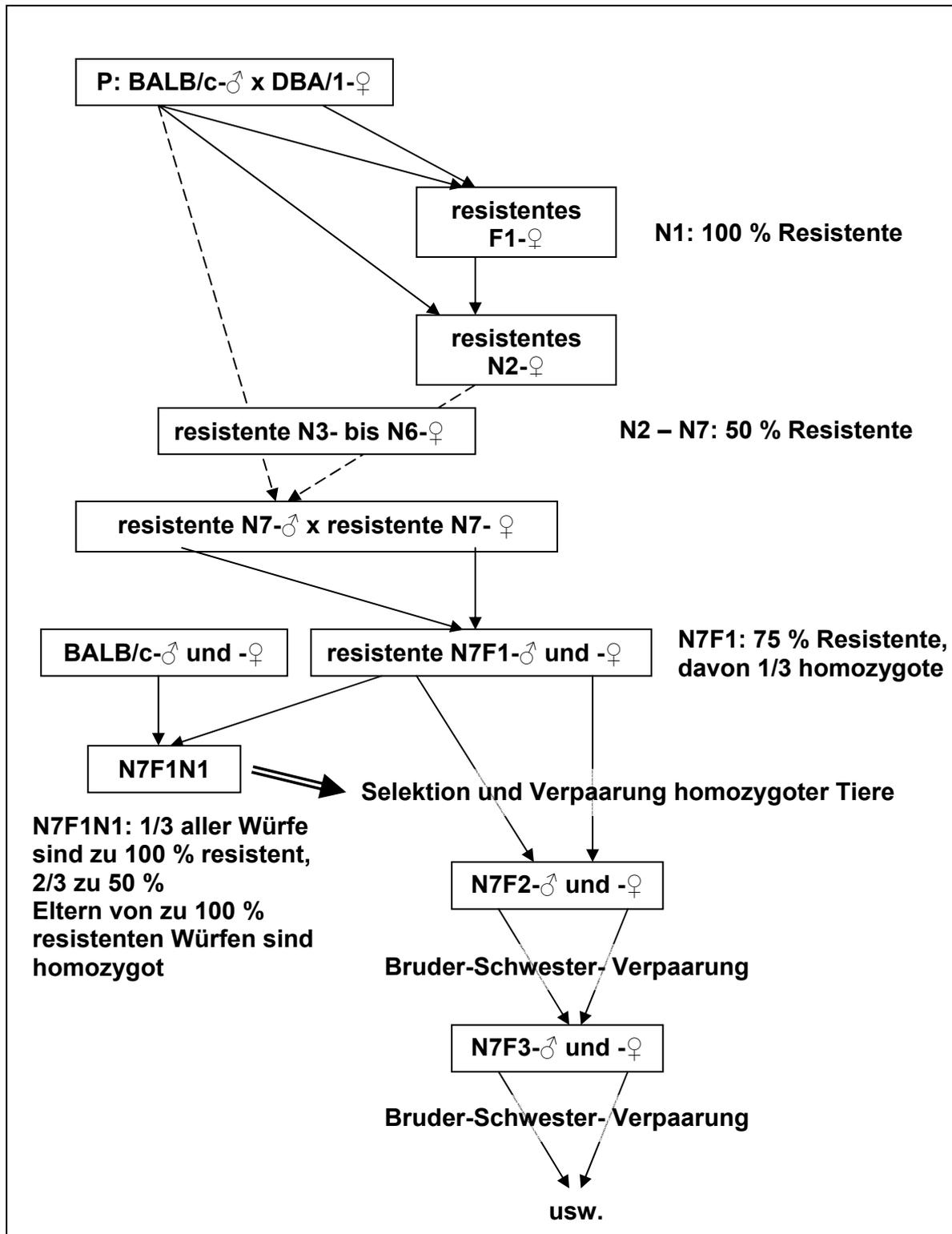


Abb. 2.1: Aufbau des homozygot empfänglichen Inzuchtstammes von der F1 bis zur N7Fx mit den erwarteten Anteilen resistenter und empfänglicher Mäuse unter Annahme eines monogenen Erbganges.

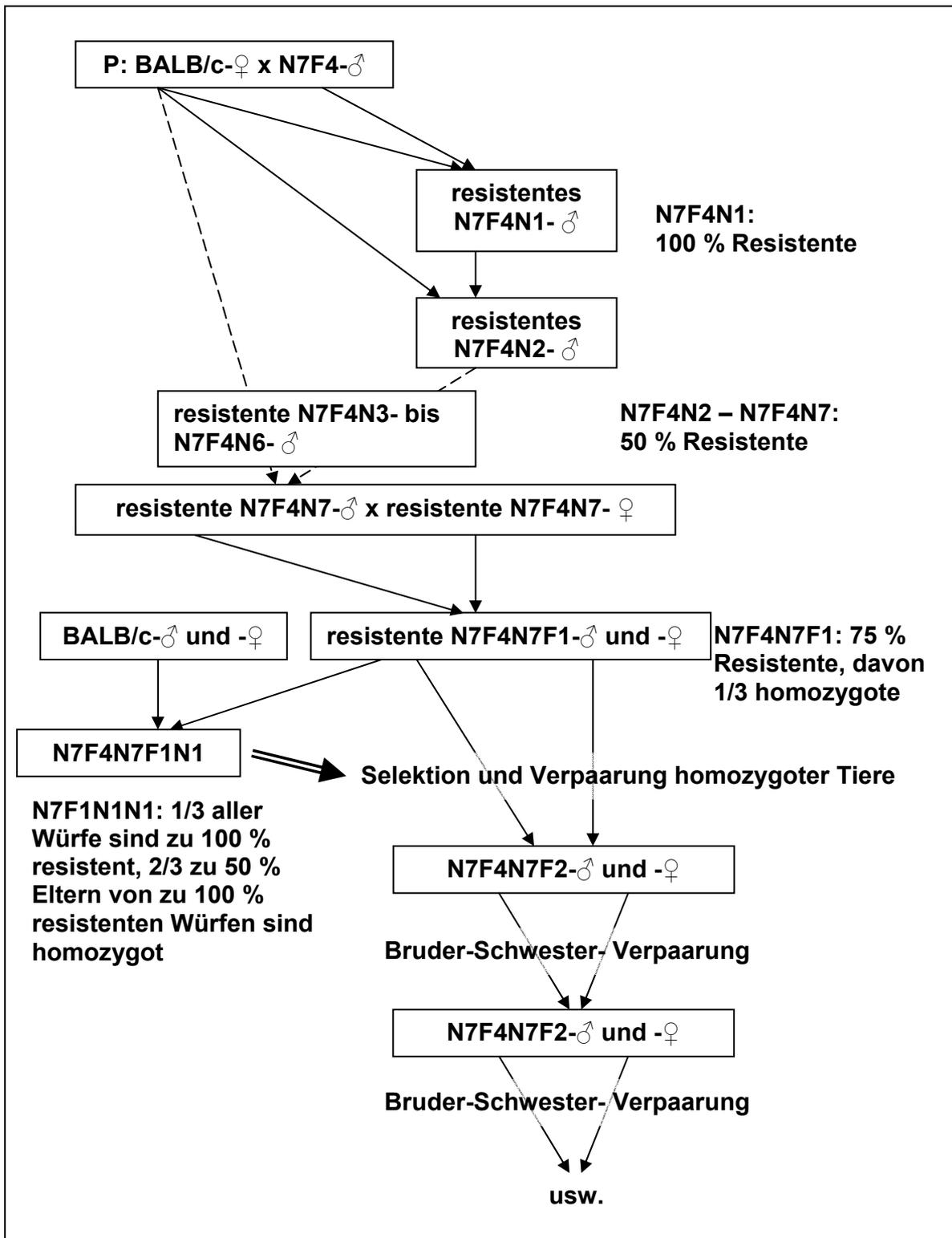


Abb. 2.2: Weitere Rückkreuzungen ab der N7F4 zur Erzielung eines zu BALB/c kongenen, mikrofilarämieresistenten Mäusestammes mit den erwarteten Anteilen resistenter und empfänglicher Mäuse unter Annahme eines monogenen Erbganges.

BALB/c weist somit für den postulierten Resistenzlocus den Genotyp *mfr^{s/s}*, DBA/1 *mfr^{r/r}* auf, heterozygote Tiere z. B. der F1 tragen *mfr^{r/s}*. BALB/c trägt den MHC-*H-2*-Haplotyp *H-2^d*, DBA/1 weist *H-2^q* auf.

Darüber hinaus wurden weitere Mäusestämme in dieser Arbeit verwendet:

DBA/2OlaHsd (DBA/2, Harlan-Winkelmann): Diese gehen wie DBA/1 auf die Zucht von Little 1909 zurück. In den Jahren 1929 und 1930 wurden mehrere Unterstämme etabliert, darunter die beiden hier verwendeten. Durch die bereits recht frühe Trennung dieser Stämme weisen sie einige genetische Unterschiede auf, unter anderem im MHC-*H-2*-Haplotyp, ansonsten haben sie aber einen weitestgehend übereinstimmenden genetischen Hintergrund. DBA/2-Mäuse weisen denselben Haplotyp *H-2^d* auf wie die suszeptiblen BALB/c-Mäuse, sind aber ebenso resistent gegen injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis* wie DBA/1-Mäuse (Hoffman *et al.* 2001).

BALB/cOlaHsd-Foxn1^{nu} (Nude, Harlan-Winkelmann): Tiere dieses Stammes tragen bei genetischem Hintergrund von BALB/c die rezessive Spontanmutation *nu* (nude = nackt) des Gens *Foxn1* (forkhead box N1) auf Chromosom 11. Dies führt bei homozygoten Tieren zu einem abnormen Haarwuchs, bzw. erscheinen sie haarlos. Sie besitzen zwar funktionelle Haarfollikel, jedoch ist die Haarentwicklung gestört.

Wegen einer fehlerhaften Entwicklung des Thymusepithels fehlt ihnen ein Thymus. Deshalb fehlen ihnen auch reife T-Zellen, dementsprechend weisen sie einen Defekt in der zellvermittelten Immunantwort auf. Dies führt auch zu einem teilweisen Defekt in der B-Zell-Entwicklung, andere Zelltypen sind nicht betroffen (Flanagan 1966; Pantelouris 1968; Thomsen *et al.* 2005).

BALB/cjHanHsd-Prkdc^{scid} (SCID, Harlan-Winkelmann): „*scid*“ steht für **S**evere **C**ombined **I**mmuno**D**eficiency. Es handelt sich um eine im Inzuchtstamm C.B-17 (BALB/c.C57BL/Ka-Igh-1b) natürlich aufgetretene, rezessive Mutation von *Prkdc* (**P**rotein **k**inase, **D**N**A** activated, **c**atalytic polypeptide) auf Chromosom 16, die zu einer starken Verminderung der Anzahl von T- und B-Zellen und praktisch zum kompletten Verlust deren Funktionalität führt. Weder sind diese Tiere zur Bildung von Antikörpern gegen verschiedene Antigene oder zur Abstoßung transplantierten Fremdgewebes in der Lage, noch reagieren ihre Milzzellen auf Stimulation mit verschiedenen B- und T-Zell-Mitogenen. Die Mutation verhindert in T- und B-Zellen die

V(D)J-Rekombination, was zur Unfähigkeit dieser Zellen zur Bildung von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren führt (Adarichev *et al.* 2004). Dementsprechend sind IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, und IgA normalerweise nicht nachweisbar. Ein geringer Teil der SCID-Mäuse („leaky“) produziert allerdings sehr geringe, doch nachweisbare Mengen eines bis dreier dieser Immunglobuline (Bosma 1992). Dies ist vom genetischen Hintergrund abhängig und auf BALB/c- oder C57BL/6-Hintergrund ausgeprägter als auf C3H-Hintergrund. NK-Zellen als wichtigste Effektoren der MHC-unabhängigen Immunantwort sind von dieser Mutation nicht betroffen und liegen ebenso wie Granulozyten und Makrophagen wie bei Nude-Mäusen in normaler Anzahl und Funktionalität vor (Bosma *et al.* 1983; Bosma & Carroll 1991; Thomsen *et al.* 2005).

BALB/c-*mb-1*^{-/-} (Igα^{-/-}, Gesellschaft für biotechnologische Forschung, GBF, Braunschweig, hergestellt am MPI für Immunbiologie, Freiburg): *mb-1* kodiert für das Immunglobulin Igα (CD79a), ein transmembranes Glykoprotein, das Expression und Funktion verschiedener B-Zell-Rezeptorkomplexe sowohl auf Progenitor- wie auf muren B-Zellen vermittelt. In Mäusen, die auf Grund eines *mb-1*-Knockouts kein Igα aufweisen, entwickeln sich B-Zellen nicht über das Progenitorstadium hinaus, welches aber anders als bei SCID keine Störung der V(D)J-Rekombination aufweist (Pelanda *et al.* 2002).

C57BL/6-*TNFRp55*^{-/-} (TNFRp55^{-/-}, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen): Die biologischen Aktivitäten des Tumornekrosefaktors (TNF) werden über zwei Oberflächenrezeptoren mit Molekulargewichten von 55 bzw. 75 kd (TNFRp55 bzw. TNFRp75) vermittelt. Die Zellen dieses Knockoutstammes auf C57BL/6-Hintergrund exprimieren kein TNFRp55, jedoch TNFRp75. T-Zell-Entwicklung und Lymphozytenpopulationen sind unverändert. Insgesamt ist der TNF-Signalweg stark unterdrückt, so ist TNF nicht mehr in der Lage, NF-κB in T-Zellen zu induzieren. TNFRp55^{-/-}-Mäuse sind gegenüber normalerweise letalen Dosen von Lipopolysacchariden oder *Staphylococcus aureus*-Enterotoxin B resistent, jedoch nicht in der Lage, eine dann tödlich verlaufende *Listeria monocytogenes*-Infektion zu kontrollieren, so dass eine entscheidende Rolle von TNFRp55 für die Wirtsabwehr von Mikroorganismen angenommen werden kann (Pfeffer *et al.* 1993; Bohn *et al.* 1998).

C57BL/6-MARCO^{-/-} (MARCO^{-/-}, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen): MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) ist ein Typ-II-

Transmembranprotein aus der Klasse A-Scavenger-Rezeptorfamilie (Kraal *et al.* 2000). Es findet sich auf Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Mikrogliazellen. Es bindet sowohl lebende wie auch durch Hitze abgetötete Bakterien. Als Liganden dienen u. a. bakterielle Lipopolysaccharide (Grolleau *et al.* 2003).

B6.129S7-*Ifngr1^{tm1Agt}* (INF- γ R^{-/-}, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen): Mäuse auf BL/6-Hintergrund, die homozygot die *Ifngr1^{tm1}*-Mutation tragen und deshalb den INF- γ -Rezeptor 1 nicht exprimieren, zeigen normale T-Zellantworten, haben jedoch Defekte in der angeborenen Immunantwort, was sich z. B. an einer gesteigerten Suszeptibilität für Infektionen mit *Listeria monocytogenes* zeigt (Huang *et al.* 1993).

B6.129P2-*Il10^{tm1Cgn}* (IL10^{-/-}, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Tübingen): Mäuse auf BL/6-Hintergrund, die homozygot die *Il10^{tm1Cgn}*-Mutation tragen, 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 (lokale Entzündungsreaktionen im vorderen Dickdarm) weniger schwerwiegend aus. Lymphozytenentwicklung und Antikörperantworten sind gegenüber Wildtypmäusen nicht verändert (Kuhn *et al.* 1993).

Außerdem wurden (Rück-)Kreuzungen verschiedener dieser Mäusestämme mit BALB/c bzw. BALB/c.DBA/1-*mfr* durchgeführt:

- DBA/2-Mäuse wurden mit BALB/c gekreuzt, die F1-Tiere wiederum mit BALB/c-Mäusen rückgekreuzt und die resultierende N2 phäno- und genotypisiert.

- Nude-Mäuse wurden ebenso wie SCID- und I α ^{-/-}-Mäuse mit homozygot resistenten BALB/c.DBA/1-*mfr*-Mäusen gekreuzt und die resultierenden F1-Tiere mit Tieren der Mutantenstämme rückgekreuzt. Bei den N2-Rückkreuzungstieren der Nude-Mäuse erübrigte sich eine Genotypisierung, da bei ihnen der Genotyp (*nu/nu*) auch phänotypisch ersichtlich war.

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Makrolon-Käfigen vom Typ II bis III. Als Bodensubstrat wurde eine Weichholzeinstreu verwendet. Wasser und Nahrung in Form von extrudierten

Alleinfutterpellets standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus betrug die Raumtemperatur 22 °C. Tiere bis zur N7, BALB/c- und DBA/1-Mäuse und ein Teil der nur für Genomanalysen verwendeten Tiere waren in konventioneller Haltung untergebracht, sämtliche für Genexpressionsanalysen verwendeten Mäuse sowie alle immundefizienten Tiere und die für die Rückkreuzungen ab der N7 verwendeten Zuchttiere hingegen wurden in Käfigen gehalten, die in Einzelbelüftung mit gefilterter Luft versorgt wurden (IVC = Individually Ventilated Cages, System von Tecniplast).

2.2 Haltung von *L. sigmodontis*

Als Zwischenwirt für *L. sigmodontis* diente der natürliche Vektor, die Tropische Rattenmilbe *Ornithonyssus bacoti*. Die Haltung der Milben erfolgte bei Temperaturen um 30 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % auf der auch für die Nagerhaltung verwendeten Holzstreu in silikongeklebten Glasaquarien von 30 cm Länge x 20 cm Breite x 20 cm Höhe. Diese Behältnisse waren oben offen und am oberen Rand außen mit einem Band aus Stoff umgeben, das mit Dimethylphtalat, einem Insektenrepellent, befeuchtet war. Um die Milben am Entkommen zu hindern, standen die Aquarien darüber hinaus zu mehreren in größeren Metallwannen, die eine Schicht Glycerin enthielten.

Der Ernährung der Milben dienten narkotisierte (Nembutal[®], Ceva, Paris) Mongolische Rennmäuse, die in kleinen Drahtkäfigen in die Milbenbehälter auf die Einstreu gesetzt wurden. Je nach Größe der Milbenkolonie wurden die Käfige dann nach einiger Zeit an den Aquarien aufgelegten Gitterdeckeln erhöht aufgehängt, um den noch auf der Rennmaus verbliebenen Milben Zeit zu geben, von den Tieren und aus den Drahtkäfigen wieder auf das Substrat zurückzugelangen und um zu verhindern, dass weitere Milben auf die Rennmäuse klettern konnten. Die Fütterung der Milben erfolgte zweimal wöchentlich.

Der Zyklushaltung dienten Baumwollratten, die natürlichen Endwirte von *L. sigmodontis*. Zur Infektion mit L3 wurden sie wie die Rennmäuse in die Milbenbehälter eingebracht und nach erfolgter Infektion einige Zeit von den anderen Nagern getrennt in Quarantäne gehalten. Entsprechend wurden die Milben mit L1 infiziert, indem sie an infizierten, patenten Baumwollratten Blut saugten. Untergebracht waren Baumwollratten und Rennmäuse in Makrolon-Käfigen der Größen III und IV, ansonsten unter gleichen Bedingungen wie die Labormäuse.

2.3 Narkose und Markieren der Versuchstiere

Um den Tieren Blut abzunehmen, reichte eine kurzzeitige Narkose. Hierfür wurden sie in einen Exsiccator gesetzt, durch den mittels einer Wasserstrahlpumpe ein Luft-Diethylether-Gemisch gesaugt wurde. Waren die Tiere etwa zehn bis fünfzehn Sekunden bewusstlos, wurden sie herausgenommen. Durch diese Art der Narkose waren die Tiere etwa eine Minute lang betäubt.

Für länger dauernde Eingriffe wie Mikrofilarieninjektionen reichte diese Art der Narkose nicht aus. Hierzu diente ein Gemisch aus Esketaminhydrochlorid (Ketanest[®]S, Parke-Davis, Berlin; Dosierung: 100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazinhydrochlorid (Rompun[®]2% von Bayer Vital, Leverkusen; Dosierung: 15 mg/kg Körpergewicht). Die Tiere wurden zunächst wieder mit Diethylether betäubt, anschließend erfolgte eine intramuskuläre Injektion dieses Gemisches in den Oberschenkel eines Hinterbeines mit einer 26G-Kanüle. Diese Art der Narkose hielt etwa eine Stunde an.

Um die Versuchstiere eines Käfigs voneinander unterscheiden zu können, erhielten sie mit einer Skin-Snip-Zange Ohrlochmarkierungen.

2.4 Gewinnung von Mikrofilarien aus Baumwollratten

Mit einer heparinisierten 60 µl-Hämatokritkapillare (Multimed, Kirchheim/Teck) wurden Baumwollratten durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus etwa 2 ml Blut entnommen, in einem heparinisierten 12 ml-Röhrchen mit Heparin-Natrium (Liquimin[®]N 2500, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) aufgefangen und mit dem gleichen Volumen Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und 2 mM L-Glutamin, GIBCO BRL, Eggenstein) vermischt. Um die Mikrofilarien hieraus zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation nach Chandrashekar *et al.* (1984) durchgeführt. Zunächst wurde aus Percoll[®] (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und 2.5M-Saccharoselösung im Verhältnis 9:1 eine 90%ige isoosmotische Stammlösung hergestellt. Aus dieser wurde dann durch Mischung mit 0.25M-Saccharoselösung im Verhältnis 1:3 eine 25%ige, durch Mischung im Verhältnis 3:7 eine 30%ige Percolllösung hergestellt. In ein 12 ml-Polystyrol-

Röhrchen wurden 2 ml der 30%igen Lösung pipettiert und darauf mit einer Pasteur-Pipette 2 ml der 25%igen Lösung geschichtet. Darüber wurden wiederum ohne die Schichtung zu zerstören die 4 ml verdünnten Blutes aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 400 g und 37 °C für 35 Minuten. Die Mikrofilarien konnten anschließend als deutlich erkennbare, milchige Bande mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und in ein weiteres 12 ml-Röhrchen überführt werden, welches mit RPMI auf 10 ml aufgefüllt und für 10 Minuten einer Zentrifugation unter gleichen Bedingungen unterworfen wurde, wodurch die Mikrofilarien ein Pellet bildeten. Der Überstand wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt, das Pellet je nach Größe in RPMI resuspendiert und in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer von 0.2 mm Tiefe mikroskopisch die Mikrofilariendichte bestimmt.

2.5 Intravenöse Mikrofilarien- und Mediuminjektion

Die Mäuse wurden narkotisiert, dann wurde ihnen mit einem elektrischen Haarschneider das Hals- und Brustfell rasiert und der Bereich desinfiziert (Softasept®, Braun, Melsungen). Die Tiere wurden auf dem Rücken liegend mit Klebestreifen auf einer Kunststoffplatte fixiert, dann wurde im Bereich der Vena jugularis die Haut etwa 10 mm längs eingeschnitten. Unter einem Stereomikroskop wurde eine die gewünschte Mikrofilarienzahl enthaltende Menge der Mikrofilariensuspension mit einer 30G-Kanüle in die Vena jugularis injiziert. Die Tiere, die für die Genexpressionsanalysen als „Scheinbehandelte“ benutzt wurden, erhielten nur eine Injektion einer entsprechenden Menge RPMI ohne Mikrofilarien. Nach der Injektion wurde die Wunde durch Zusammendrücken der Wundränder verschlossen. Nach der Operation kamen die Tiere in mit Zellstoff ausgelegte Käfige, eine bis drei Stunden nach der Operation wurde den Tieren erstmals Blut abgenommen, um die Mikrofilariendichte zu bestimmen. Nach vier Tagen wurden sie auf normale Streu umgesetzt.

2.6 Vollblut- und Plasmaübertragung

Den Spendertieren abgenommenes Blut wurde entweder direkt den Empfängertieren intravenös injiziert, oder es wurde zunächst Plasma hieraus gewonnen. Dazu wurde das Spenderblut sofort nach der Entnahme in einem 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß bei 4 °C und 4500 g zentrifugiert und das Plasma abgenommen. In der Regel wurde vor der Übertragung Blut bzw. Plasma mehrerer Spender gemischt, um auf das gewünschte Volumen zu erreichen.

2.7 Intrapleurale Mikrofilarieninjektion

Die Mäuse wurden wie beschrieben narkotisiert, der Brustbereich enthaart und desinfiziert. Eine 30G-Kanüle wurde dann im Brustbereich bis in die Pleura eingestochen und 100 000 Mikrofilarien in RPMI injiziert.

2.8 Natürliche Infektion mit dem dritten Larvenstadium

In ein 50 ml-Polystyrol-Röhrchen wurden je eine narkotisierte Maus sowie 50 mit *L. sigmodontis* infizierte Milben verschiedener Stadien gegeben. Nach etwa einer Stunde waren deutlich jeweils mehrere vollgesaugte Milben zu erkennen, woraufhin die Mäuse wieder aus den Röhrchen genommen wurden. Eine Angabe der Menge der übertragenen L3 ist so nicht möglich. Da alle Milben jedoch aus derselben Kolonie stammten und zum selben Zeitpunkt infestiert wurden, ist aber davon auszugehen, dass auf alle Mäuse eine ähnliche Anzahl L3 übertragen wurde.

2.9 Töten von Versuchstieren

Die Tiere wurden in eine geschlossene Kunststoffbox gesetzt, in die durch ein seitliches Loch etwa zwei Minuten lang bis zum Tod langsam CO₂ eingeleitet wurde.

2.10 Gewinnung und Implantation von L4 und Adultwürmern

Infizierte Baumwollratten wurden getötet, die Bauchseite geöffnet und die Würmer aus der Pleurahöhle gespült. Sie wurden in Petrischalen mit RPMI überführt und einige Zeit bei 37 °C stehen gelassen, damit sich die oftmals stark miteinander verschlungenen Adultwürmer voneinander lösten. Anhand von Unterschieden in Länge und Dicke wurden Männchen und Weibchen selektiert und getrennt in frisches Medium überführt. Bei L4 ist eine solche Differenzierung nicht möglich.

Je fünf adulte, lebende Männchen bzw. Weibchen bzw. 50 L4 wurden mit etwa 1.5 ml RPMI mit einer Kunststoffpasteurpipette aufgesaugt. Den Versuchstieren wurde die rechte Bauchseite enthaart, desinfiziert und die Tiere auf einer Platte fixiert. Ein etwa 1 cm langer Schnitt eröffnete die Bauchhaut, ein weiterer Schnitt das Peritoneum. Durch diese Öffnung wurde die Pipette geführt, mit der die Würmer zusammen mit dem RPMI in die Bauchhöhle gespült wurden. Anschließend wurde der Peritonealschnitt einfach (Vicryl 5/0, geflochten, Ethicon, Edinburgh), der Hautschnitt mit Rückstich doppelt vernäht (Ethilon 5/0, monofil, Ethicon, Edinburgh). Kontrolltieren wurden entweder je sechs durch Einfrieren abgetötete adulte Männchen implantiert, oder bei ansonsten gleichem operativem Eingriff anstelle von Adultwürmern 1.5 ml RPMI in das Peritoneum eingebracht.

2.11 Blutabnahme und Bestimmung der Mikrofilariendichte bei Mäusen

Einer kurzzeitig betäubten Maus wurde mit einer Hämatokritkapillare (Minicaps, heparinisiert, 10 µl, Multimed, Kirchheim/Teck) retroorbital Blut entnommen und in einem 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Daraus wurden 30 µl möglichst schnell in ein weiteres Reaktionsgefäß mit 1 ml FACS™-Lysing-Solution (Becton Dickinson, San Jose) überführt, wodurch auf eine Heparinisierung verzichtet werden konnte. Es wurde kurz auf einem Vortex gemischt und nach fünf Minuten für zehn Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Mikrofilarienpellet in der Restflüssigkeit resuspendiert, auf einen Objektträger überführt und unter dem Mikroskop die Mikrofilarien des gesamten Flüssigkeitsvolumens ausgezählt, um die Mikrofilariendichte je 30 µl Blut zu bestimmen. In der Regel wurde zwischen einer und drei Stunden nach der Injektion von Mikrofilarien das erste Mal die Mikrofilariendichte bestimmt, um zu überprüfen, ob die Injektion erfolgreich verlief, anschließend wurde täglich bis Tag 4 *p. i.* oder zumindest an Tag 4 *p. i.* Blut entnommen, um Resistente und Suszeptible klassifizieren zu können.

2.12 Injektion und Nachweis von Mikropartikeln

Es wurden sowohl Polystyrol- als auch Resaminharz-Mikropartikel (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit Durchmessern von 5 und 10 µm verwendet, die schätzungsweise eine ähnliche Dichte wie Mikrofilarien aufweisen. Die Polystyrolpartikel waren unmarkiert, die Resaminharzpartikel mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Die wässrigen Partikelsuspensionen wurden mit RPMI 1:50 verdünnt und den Versuchstieren eine zwischen 1×10^5 und 1×10^6 (5 µm) bzw. 20 000 (10 µm) Mikropartikel enthaltende Flüssigkeitsmenge entsprechend der Mikrofilarieninjektion in die Vena jugularis injiziert. 30 Minuten nach der Injektion wurde Blut abgenommen und die in 30 µl enthaltenen Mikropartikel nach Zellyse im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dann wurden die Mäuse getötet und die Lungen entnommen. Diese wurden in RPMI homogenisiert, zwischen zwei Glasobjektträgern gequetscht und das gesamte Präparat im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.13 Hauttransplantation bei kongenen Mäusen

Je einer resistenten (N7F9) und einer suszeptiblen (N7F4) Maus wurde nach Narkose, Enthaarung und Desinfektion ein etwa 1 Cent-großes Hautstück mit einer Schere im Nackenbereich entnommen. Dieses wurde, um ein Zusammenrollen zu verhindern, zunächst auf einer mit Agarose ausgegossenen Petrischale und mit RPMI bedeckt mit Nadeln festgesteckt und dann entgegen der normalen Haarwuchsrichtung des Empfängertieres diesem an die entsprechende Stelle übertragen und an mehreren Stellen mit Ethilon 5/0 vernäht.

2.14 Genomanalyse an BALB/c x DBA/1-Kreuzungen

Um für Resistenz bzw. Suszeptibilität ursächliche genetische Unterschiede zwischen den aus DBA/1 und BALB/c erzielten kongenen Mäusen zu ermitteln, wurden genomweite Mikrosatellitenanalysen durchgeführt. Mikrosatelliten (auch Short Tandem Repeats) sind nicht-kodierende DNA-Sequenzen, die über das gesamte Genom verstreut sind. Sie bestehen aus bis zu einhundert Mal tandemartig wiederholten Motiven von einem bis sechs Basenpaaren (Tautz & Schlötterer 1994; Weber & Wong 1993). Mikrosatelliten sind im gesamten Genom viel häufiger, als es die Häufigkeit der einzelnen Basen im gesamten Genom erwarten ließe (Cox & Mirkin 1997; Pupko & Graur 1999). Sie weisen außerdem Mutationsraten auf, die weit über denen nicht-repetitiver Chromosomenabschnitte liegen. Mutationen stellen hierbei v. a. Addition oder Depletion von Repeat-Einheiten dar, wodurch eine Vielzahl von Längenpolymorphismen entsprechender Mikrosatelliten zwischen verschiedenen Individuen entsteht (Dib *et al.* 1996). Durch Polymerasekettenreaktion (PCR) lassen sich diese Längenunterschiede einfach nachweisen. Für etliche Labormausstämme ist bereits eine Vielzahl von Mikrosatelliten mit Längenpolymorphismen bekannt, mit denen eine Grobkartierung von genetischen Unterschieden etwa zwischen näherungsweise kongenen Mäusestämmen möglich ist.

2.14.1 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung wurde mit einem Puregene™ Genomic DNA Purification Tissue Kit (Gentra Systems, Minneapolis) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Dem getöteten Versuchstier die Leber entnehmen, ca. 10 - 20 mg davon werden für die DNA-Isolierung benötigt, der Rest wird bei -28 °C tiefgefroren
- Das Leberstück in ein 1.5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 300 µl Cell Lysis Solution überführen und mit einem Homogenisator zerkleinern
- 1.5 µl Proteinase K Solution zugeben, 25-mal invertierend mischen
- Über Nacht bei 55 °C inkubieren, am nächsten Tag kurz mischen
- 1.5 µl RNase A Solution zugeben, 25-mal mischen
- Eine Stunde bei 37 °C inkubieren
- Zelllysat auf Raumtemperatur abkühlen lassen
- 100 µl Protein Precipitation Solution hinzugeben
- Bei hoher Geschwindigkeit auf dem Vortex 20 Sekunden lang mischen
- Drei Minuten bei 16 000 g und 4 °C zentrifugieren
- Den Überstand in ein neues Reaktionsgefäß mit 300 µl eiskaltem 100%igem Isopropanol überführen
- 50-mal vorsichtig invertierend mischen
- Mindestens eine Minute bei 16 000 g und 4 °C zentrifugieren
- Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Reaktionsgefäß umgedreht auf Fließpapier mehrere Minuten trocknen lassen
- 300 µl 70%igen Ethanol zugeben
- DNA-Pellet durch vorsichtiges Schütteln lösen und waschen
- Mindestens eine Minute bei 16 000 g und 4 °C zentrifugieren
- Ethanol vorsichtig abpipettieren, das Reaktionsgefäß 30 min trocknen lassen
- 50 µl DNA Hydration Solution zugeben
- Über Nacht bei Raumtemperatur inkubieren, zur vollständigen Lösung der DNA kurz mischen

In einem Photometer wurde der DNA-Gehalt der Proben bestimmt und durch Verdünnung mit DNA Hydration Solution auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Danach wurden die Proben bei -28 °C eingefroren bzw. zur Analyse an die GBF in Braunschweig gesandt.

2.14.2 Mikrosatelliten-PCR

Für eine erste genomweite Analyse möglicher Kopplung von Genotypen mit resistenten Phänotypen wurden an der GBF DNAs von 72 verschiedenen Mäusen wie in Tabelle 2.1 angegeben eingesetzt.

Anzahl	Generation	Phänotyp	vermuteter Genotyp
39	N2	resistent	R/s
3	N7F1	resistent	R/R
2	N7F1	resistent	R/s
3	N7F1	suszeptibel	s/s
11	N7F1N1	resistent	R/s
2	N7F1N1	suszeptibel	s/s
6	N7F2	resistent	R/R
6	N7F3	resistent	R/R

Tab. 2.1: Tiere, deren DNA für die erste genomweite Mikrosatellitenanalysen eingesetzt wurde. R = DBA/1-Allel für den Resistenzlocus, s = BALB/c-Allel.

Diese DNA-Proben wurden mit den 85 in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgelisteten Mikrosatellitenmarkern, die nach Angaben von CIDR (Center for Inherited Disease Research, <http://www.cidr.jhmi.edu/>) aufgrund von Längenpolymorphismen informativ für Kreuzungen aus BALB/c und DBA/1 sind, in PCR-Reaktionen eingesetzt. Die entsprechenden Primer sind bei CIDR angegeben. Die jeweiligen Forward-Primer waren am 5`-Ende mit FAM, VIC oder NED fluoreszenzmarkiert. PCR Produkte (PCR-Bedingungen siehe Tabelle 2.4) mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen wurden gepoolt und in einem automatisierten MegaBACE DNA Analysis System (Molecular Dynamics und Amersham Biosciences) untersucht. Zur Auswertung der Allelsignale wurde Mega BACE Genetic Profiler, Version 1.1, eingesetzt (Goldmann *et al.* 2005).

Chromosom	Länge [cM]	Marker	Position [cM]	bp (DBA/1)	bp (BALB/c)
1	127	D1Mit430	10	123	127
		D1Mit236	25.7	90	105
		D1Mit215	47	151	167
		D1Mit308	62.1	219	203
		D1Mit507	87.8	200	210
		D1Mit406	101.2	125	118
2	114	D2Mit61	34	111	98
		D2Mit285	86	164	162
		D2Mit145	98.5	161	169
3	95	D3Mit203	11.2	259	263
		D3Mit67	28	236	232
		D3Mit311	45.2	121	111
		D3Mit320	71.8	105	107
		D3Mit200	77.3	88	104
4	84	D4Mit18	5.2	221	208
		D4Mit348	40	146	246
		D4Mit203	60	102	109
		D4Mit170	66.6	240	246
5	92	D5Mit348	8	240	252
		D5Mit352	20	109	103
		D5Mit201	42	97	99
		D5Mit10	54	193	178
		D5Mit95	68	162	164
6	75	D6Mit123	29	265	267
		D6Mit67	41.5	152	160
		D6Mit328	49.3	148	124
		D6Mit14	71.2	157	167
7	74	D7Mit294	8	169	171
		D7Mit228	18	203	188
		D7Mit248	27.8	117	76
		D7Mit323	50	253	215
		D7Mit259	72	249	229
8	82	D8Mit289	11	103	142
		D8Mit63	15	234	232
		D8Mit45	40	106	100
		D8Mit88	58	144	131
		D8Mit49	67	225	201
9	74	D9Mit71	29	124	
		D9Mit336	35	167	159
		D9Mit355	53	132	127
		D9Mit151	72	115	107

Tab. 2.2: Mikrosatelliten für die erste genomweite Mikrosatellitenanalyse an DNAs der in Tab. 2.1 angegebenen Mäuse mit ihrer Position in cM auf dem jeweiligen Chromosom von Chromosom 1 bis 10 und den Längenpolymorphismen zwischen BALB/c- und DBA/1-Allelen. Nomenklatur der Mikrosatelliten: D = DNA-Marker, Zahl = jeweiliges Chromosom, Buchstabenkombination = Kürzel der Institution, die den Marker entwickelt hat (z. B. Mit für Massachusetts Institute of Technology), Zahl = Durchnummerierung der Marker eines Chromosoms.

Chromosom	Länge [cM]	Marker	Position [cM]	bp (DBA/1)	bp (BALB/c)
10	77	D10Mit86	17	225	218
		D10Mit31	36	141	144
		D10Mit230	49	126	122
		D10Mit103	70	175	179
11	80	D11Mit2	2.4	107	97
		D11Mit86	28	97	89
		D11Mit4	37	213	170
		D11Mit289	55	165	171
		D11Mit126	63	193	201
12	61	D12Mit60	16	102	111
		D12Mit91	29	159	157
		D12Mit158	38	77	94
		D12Mit118	45	130	138
		D12Mit280	55	146	126
		D12Mit133	56	105	119
		D12Nds2	59	167	177
13	80	D13Mit16	10	207	170
		D13Mit88	21	137	149
14	69	D14Mit98	3	147	154
		D14Mit174	10.5	137	139
		D14Mit39	30	247	260
		D14Mit263	44.4	112	118
		D14Mit170	63	211	207
15	81	D15Mit13	6.7	131	149
		D15Mit143	21.4	132	134
		D15Mit161	69.2	259	263
		D15Mit262	51.1	90	84
		D15Mit67	40.9	175	181
16	72	D16Mit153	56.8	154	156
		D16Mit52	66.8	134	129
17	82	D17Mit51	22.9	157	159
		D17Mit10	24.5	160	166
		D17Mit93	44.5	178	163
		D17Mit122	51.9	129	148
18	60	D18Mit222	6	204	118
		D18Mit208	38	175	173
		D18Mit48	50	168	177
19	56	D19Mit68	6	117	107
		D19Mit88	15	119	127
		D19Mit88	34	159	151
X	76	DXMit68	17.3	141	139
		DXMit19	43.2	261	273
		DXMit172	48.7	219	201
		DXMit121	67	127	111

Tab. 2.3: Mikrosatelliten für die erste genomweite Mikrosatellitenanalyse an DNAs der in Tab. 2.1 angegebenen Mäuse mit ihrer Position in cM auf dem jeweiligen Chromosom von Chromosom 11 bis X und den Längenpolymorphismen zwischen BALB/c- und DBA/1-Allelen. Zur Nomenklatur der Mikrosatelliten siehe Tab. 2.2.

Schritt	Aktion	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	95 °C	12 min	1 x
2	Denaturierung	94 °C	15 s	10 x
	Annealing	55-60 °C	15 s	
	Extension	72 °C	30 s	
3	Denaturierung	89 °C	15 s	20 x
	Annealing	55-60 °C	15 s	
	Extension	72 °C	30 s	
4	Extension	72 °C	10 min	1 x

Tab. 2.4: PCR-Bedingungen nach Goldmann *et al.* (2005) für die genomweite Mikrosatellitenanalyse an DNAs der in Tab.2.1 angegebenen Mäuse mit den in Tab. 2.2 und Tab. 2.3 angegebenen Markern. Die Ansätze wurden in 10 µl Reaktionsvolumen durchgeführt mit 25 mM MgCl₂, 5 µM jedes Primers, 2.5 mM dNTPs, 50 ng Proben-DNA, 0.5 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Applied Biosystems).

Für weitere genomweite Mikrosatellitenanalysen an insgesamt 255 Mäusen der N2 wurden teilweise andere Marker als in den Tabellen 2.2 und 2.3 und dazu nicht-fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt (siehe Tabelle 2.5). Diese Marker wurden den Angaben des Broad Institute (Cambridge, Massachusetts) auf <http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/mouse/index#genetic> entnommen, die entsprechenden Primersequenzen sind dort angegeben. Die Längenspolymorphismen weichen bei Markern, die auch für die erste Analyse verwendet wurden, teilweise etwas ab, da CIDR jeweils etwas abgeänderte Primersequenzen verwendet. Aktuell wurden diese 255 DNAs mit 33 Markern bis Chromosom 15 untersucht.

Chromosom	Länge [cM]	Marker	Position [cM]	bp (DBA/1)	bp (BALB/c)
1	127	D1Mit406	101.2	125	118
2	114	D2Mit145	98.5	161	169
3	95	D3Mit311	45.2	122	110
		D3Mit200	77.3	107	127
4	84	D4Mit203	60	102	109
5	92	D5Mit348	8	115	123
		D5Mit10	54	203	190
6	75	D6Mit328	49.3	148	126
		D6Mit14	71.2	149	152
7	74	D7Mit228	18	159	142
		D7Mit323	50	146	106
		D7Mit259	72	152	130
8	82	D8Mit88	58	128	116
		D8Mit49	67	152	130
9	74	D9Mit71	29	104	104
		D9Mit336	35	116	106
10	77	D10Mit86	17	156	150
11	80	D11Mit2	2.4	124	112
		D11Mit86	28	134	126
		D11Mit4	37	300	242
		D11Mit289	55	126	132
		D11Mit126	63	193	201
12	61	D12Mit280	55	146	126
		D12Mit150	59	107	153
		D12Nds2	59	162	165
		D12Mit144	61	309	303
13	80	D13Mit16	10	207	170
		D13Mit88	21	170	180
		D13Mit256	40	82	94
14	69	D14Mit98	3	146	152
		D14Mit39	30	232	246
		D15Mit13	39.6	118	138
15	81	D14Mit263	44.4	112	118

Tab. 2.5: Mikrosatelliten für die zweite genomweite Mikrosatellitenanalyse an DNAs von 255 N2-Mäusen mit ihrer Position in cM auf dem jeweiligen Chromosom von Chromosom 1 bis 15 und den Längenpolymorphismen zwischen BALB/c- und DBA/1-Allelen. Zur Nomenklatur der Mikrosatelliten siehe Tab. 2.2.

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte hier durch herkömmliche Ethidiumbromidfärbung und Auftrennung auf einem 4%igen MetaPhor[®]-Agarose-Gel nach folgendem Protokoll:

- 6 g MetaPhor[®]-Agarose (Cambrex, Rockland) in 150 ml 6 °C kalten TBE-Puffer [10.78 g Trizma-Base (Sigma-Aldrich, St. Louis), 5.50 g Borsäure und 0.75 g EDTA] langsam einrühren
- Unter Rühren auf 120 °C erhitzen
- Ca. 15 Minuten kochen bis zum vollständigen Auflösen der Agarose
- Abkühlung auf 55-60 °C
- 10 µl Ethidiumbromid zugeben
- Gel gießen und bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen
- Ca. 20 Minuten bei 4 °C lagern

Gellauf: - Laufpuffer 1x TBE
 - 10 µl PCR-Produkt + 5 µl Ladepuffer (Peqlab, Erlangen)

Neben den genomweiten Mikrosatellitenanalysen an den in Tabelle 2.1 aufgeführten Tieren wurden an weiteren Tieren höherer Rückkreuzungsgenerationen (Tabelle 2.6) Mikrosatellitenanalysen nur mit aus den Tabellen 2.3 und 2.5 kombinierten Markern für Chromosom 12 (Tabelle 2.7) durchgeführt.

Anzahl	Generation	Phänotyp	vermuteter Genotyp
2	N7	resistent	R/R
2	N7F6	resistent	R/R
3	N7F7	resistent	R/R
1	N7F8	resistent	R/R
2	N13	resistent	R/s
4	N14	resistent	R/s
3	N14	suszeptibel	s/s
7	N14F1	resistent	R/s
5	N14F1	suszeptibel	s/s
69	N15	resistent	R/s
12	N15	suszeptibel	s/s

Tab. 2.6: Mäuse verschiedener Rückkreuzungsgenerationen, deren DNA zur Feinkartierung der Kandidatenregion auf Chromosom 12 mit den in Tab. 2.7 angegebenen Mikrosatelliten eingesetzt wurde. R = DBA/1-Allel für den Resistenzlocus, s = BALB/c-Allel.

Marker	Position [cM]	bp (DBA/1)	bp (BALB/c)
D12Mit 118	45 cM	124	134
D12Mit 280	55 cM	146	126
D12Mit 133	56 cM	107	117
D12Nds 2	59 cM	162	165
D12Mit 150	59 cM	107	153
D12Mit 144	61 cM	309	303

Tab. 2.7: Mikrosatelliten für die Feinkartierung der Kandidatenregion auf Chromosom 12 an DNAs der in Tab. 2.6 angegebenen Tiere mit ihrer Position in cM und den Längenpolymorphismen zwischen BALB/c- und DBA/1-Allelen. Zur Nomenklatur der Mikrosatelliten siehe Tab. 2.2.

PCR-Bedingungen und Auswertung entsprachen dem Vorgehen bei den 255 N2-Tieren.

2.14.3 Statistische Auswertung der Genomanalyse

Die Angabe der physikalischen Lage von Genen zueinander und auf den Chromosomen erfolgt in Centimorgan (cM), wobei 1 cM dem Abstand zweier Gene auf einem Chromosomenabschnitt entspricht, bei dem eine Rekombination mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % zu erwarten ist. Je enger benachbart zwei Gene sind, desto unwahrscheinlicher ist eine Rekombination, d. h. die Wahrscheinlichkeit für eine gekoppelte Vererbung nimmt zu. Die Bestimmung des Kopplungsgrades erfolgt nach Edwards (1987) über die Berechnung von Lod-scores (logarithm of odds) nach der Formel

$$\text{Lod} = r \log (2c) + n \log (2p),$$

wobei c = Rekombinationsrate, $p = 1 - c$, r = Anzahl rekombinanter Individuen und n = Anzahl nicht rekombinanter Individuen. Die Rekombinationsrate c errechnet sich aus $c = r/n$, wobei r = Anzahl rekombinanter Individuen und n = gesamte Stichprobe (Green 1981). Ein Lod-score gibt das Verhältnis der Wahrscheinlichkeit einer Kopplung zweier Gene gegenüber einer freien Rekombination an. Bei einem Lod-score ≥ 3 (Wahrscheinlichkeit für eine Kopplung von $\geq 1000:1$) ist von einer Kopplung der Gene auszugehen.

Die statistische Auswertung der Genotypen für die untersuchten Markerregionen wurde für die in Tabelle 2.1 aufgeführten Tiere mit der Software GENE-LINK durchgeführt (Montaguelli 1991). Hierzu wurde bei Heterozygotie, d. h. Vorliegen von DBA/1- und BALB/c-Allelen an entsprechenden Genloci, „+“, bei Homozygotie, also Vorliegen von lediglich BALB/c-Allelen, „-“ eingetragen. Diese eingegebenen Codes für den genetischen Zustand der an den verschiedenen Genloci wurden dann mit dem hypothetischen Resistenzlocus unter Annahme von völlig einheitlicher Homozygotie bei suszeptiblen und Heterozygotie bei resistenten Tieren der zweiten Rückkreuzungsgeneration verglichen und daraus die Kopplungswahrscheinlichkeiten und Abstände der bekannten Marker zu dem postulierten Resistenzlocus berechnet. Die Signifikanz der Kopplung eines Mikrosatellitenmarkers mit dem Resistenzlocus wurde dabei mit dem Chi-Quadrat-Test ermittelt. Darüber hinaus wurde die wahrscheinlichste Anordnung des Resistenzlocus in Bezug zu den verschiedenen Mikrosatellitenmarkern über einen „Lod-score for order“ nach White *et al.* (1985) berechnet.

Die statistische Analyse für die 255 N2-Tiere sowie die in Tabelle 2.6 aufgeführten Tiere erfolgte mit der Software Map Manager QTX17b (Manly, Cudmore & Meer 2001), wobei die gleichen Parameter wie mit GENE-LINK bestimmt wurden.

2.15 Genotypisierung weiterer Labormauskreuzungen

Mit N2-Nachkommen der in 2.1 beschriebenen (Rück-)Kreuzungen verschiedener Inzuchtstämme mit dem homozygot resistenten, zu BALB/c kongenen Stamm BALB/c.DBA/1-*mfr* wurden mit dem Mikrosatellitenmarker D12Nds2 (Tabelle 2.3) Genotypisierungs-PCR durchgeführt.

2.15.1 DNA-Isolierung

Den Tieren wurde je ein ca. 4 mm² großes Ohrgewebestück, wie es bei der Markierung der Versuchstiere (2.4) anfällt, entnommen und mit 75 µl DirectPCR[®] Lysis Reagent (Viagen, Los Angeles) und 1 µl Proteinase K (20 µg/µl) in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 55 °C über Nacht in einem Hybridisierungssofen

sowie eine weitere Inkubation bei 85 °C im Wasserbad für 45 min. Nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 10 s wurde der DNA-haltige Überstand abgenommen.

2.15.2 Mikrosatelliten-PCR

Die PCR-Bedingungen sind gegenüber den in Tabelle 2.4 angegebenen modifiziert, siehe Tabelle 2.8.

Schritt	Aktion	Temperatur	Dauer	Anzahl Zyklen
1	Denaturierung	94 °C	10 min	1 x
2	Denaturierung	94 °C	1 min	40 x
	Annealing	52 °C	1 min	
	Extension	72 °C	1.5 min	
3	Extension	72 °C	10 min	1 x

Tab. 2.8: PCR-Bedingungen für die Mikrosatellitenanalyse mit dem Marker D12Nds2 an DNAs von N2-Tieren der in 2.1 angegebenen Kreuzungen. Die Ansätze wurden in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt mit 0.4 µM jedes Primers, 200 µM dNTPs, 1.5 µl gelöste Proben-DNA (ca. 20 ng), QIAGEN PCR Buffer (1.5 mM MgCl₂), 1.25 U AmpliTaq DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden).

Die Darstellung der PCR-Produkte erfolgte auch hier durch herkömmliche Ethidiumbromid-färbung und Auftrennung auf einem 4%igen MetaPhor[®]-Agarose-Gel (2.13.2).

2.16 Genexpressionsanalysen bei Labormäusen nach Infektion mit *L. sigmodontis*

Neben der Untersuchung von der Resistenz und Suszeptibilität zu Grunde liegenden genetischen Faktoren auf DNA-Ebene wurden zur Beschreibung der bei einer Infektion mit verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis* ablaufenden Vorgänge auf RNA-Ebene Genexpressionsanalysen an RNA aus Lungengewebe mit cDNA-Oligonukleotid-Microarrays von Affymetrix durchgeführt. Lungengewebe wurde deshalb eingesetzt, weil die Lunge als Reservoir für Mikrofilarien angesehen wird und dort auch der Hauptabbauort der Mikrofilarien vermutet wird (Pfaff *et al.* 2000²), so dass dort auch entsprechende

Genexpressionsaktivitäten nachzuweisen sein sollten. Es wurden die Genexpressionsmuster nach Mikrofilarieninjektion sowie nach kombinierter Adultweibchenimplantation und Mikrofilarieninjektion untersucht.

2.16.1 Genexpression nach Injektion von Mikrofilarien

2.16.1.1 Versuchstiere

Es wurden männliche resistente N7- und BALB/c-Mäuse im Alter von ca. 6 bis 8 Wochen mit 3 verschiedenen Vorbehandlungen (naiv, scheinbehandelt, mit Mikrofilarien infiziert) verwendet. Folgende Tierzahlen wurden jeweils eingesetzt:

- Unbehandelt: 5 BALB/c und 5 Resistente
- Scheinbehandelt: 3 BALB/c und 4 Resistente
- Infiziert: 3 BALB/c und 6 Resistente

Insgesamt wurden also 26 Microarrayexperimente durchgeführt.

2.16.1.2 Lungenentnahme

Die Tiere wurden mit CO₂ getötet (scheinbehandelte und infizierte Tiere 2 Stunden nach dem Eingriff), durch Eintauchen in 70%iges Ethanol desinfiziert und in einer Sterilbank auf einer mit Aluminiumfolie eingeschlagenen und desinfizierten Styroporplatte auf dem Rücken liegend fixiert. Die Haut wurde entlang der Körpermitte zum Kopf und den Extremitäten hin aufgeschnitten und seitlich weggeklappt festgesteckt. Die Pleura wurde aufgeschnitten, die Lunge mit möglichst geringer Blutung im Ganzen entnommen und in ein 12 ml-Röhrchen mit 4 ml Trizol[®] (Invitrogen) überführt, das die RNA fixiert und eine Zerstörung durch Nukleasen verhindert. Die Lungen wurden dann auf Eis an die Microarray Facility des Instituts für Medizinische Genetik, Tübingen, übergeben, wo die weitere Verarbeitung der Proben erfolgte.

2.16.1.3 Probenaufarbeitung

In der Microarray Facility wurde zunächst RNA aus den Gewebeproben isoliert. Anschließend erfolgte reverse Transkription in cDNA und daraufhin durch *in vitro*-Transkription die Umwandlung in cRNA bei gleichzeitigem Einbau biotinmarkierter Nukleotide. RNA-Qualität und -Quantität wurden mittels eines 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Palo Alto) photometrisch bestimmt. Nun wurden MG U74A Oligonukleotid-Microarrays von Affymetrix mit den Targetsequenzen hybridisiert und in einem Scanner die Signalstärke für jeden Punkt des Arrays bestimmt. MG U74A weisen 12488 Probe Sets auf, die jeweils einzelne Gene bzw. Expressed Sequence Tags (EST) repräsentieren.

2.16.1.4 Auswertung der Microarrays

Die Bildverarbeitung sowie Berechnung der Signalstärken und weiterer Parameter erfolgten zunächst mit der Affymetrix Microarray Suite Version 5.0.0.032 (MAS). Eingestellt wurde zur einheitlichen Skalierung der verschiedenen Arrays ein Target Signal von 150.

Signalstärken und Detection wurden direkt in Microsoft Excel übertragen. Für die Detection werden „A“ (absent), „P“ (present) oder „M“ (marginal) angegeben, die aussagen, ob ein Messwert tatsächlich zu berücksichtigen oder als Rauschen zu bewerten ist. „A“ wurde durch „0“, „P“ durch „1“, „M“ durch „0.5“ ersetzt.

Um Unterschiede in der Genexpression zwischen verschiedenen Versuchsgruppen zu ermitteln, wurden in der MAS Batchanalysen durchgeführt, d. h. paarweise Vergleiche jedes Chips der einen mit jedem Chip der anderen Versuchsgruppe. Berechnet werden hierbei Signal Log Ratios, also logarithmierte Verhältnisse der Signale zweier Chips zueinander. Aus den Batchanalysen wurden Signal Log Ratio sowie Signal Log Ratio High, Signal Log Ratio Low sowie der Change in Excel übertragen. „NC“ (no change) wurde durch „0“, „I“ (increase) durch „1“, „MI“ (medium increase) durch „0.5“, „D“ (decrease) durch „- 1“ und „MD“ (medium decrease) durch „- 0.5“ ersetzt.

Folgende Vergleiche wurden berechnet, wobei die zweite Versuchsgruppe jeweils die Baseline darstellt:

- unbehandelte Resistente vs. unbehandelte BALB/c
- Resistente nach Scheinbehandlung vs. entsprechende BALB/c
- Resistente nach Mikrofilarieninjektion vs. entsprechende BALB/c
- Resistente nach Mikrofilarieninjektion vs. Resistente nach Scheinbehandlung
- unbehandelte Resistente vs. Resistente nach Scheinbehandlung

Um Gene als in einem Vergleich sicher differenziell exprimiert zu betrachten, mussten im Durchschnitt einer Versuchsgruppe und eines Vergleiches folgende Kriterien erfüllt werden:

Bei heraufregulierten Genen:

- Signalstärke des Experiment-Arrays ≥ 50
- Signal Log Ratio ≥ 1
- Change ≥ 0.66
- Detection des Experiment-Arrays ≥ 0.66
- Signal Log Ratio Low ≥ 0.5

Dies bedeutet, dass bei einem hochregulierten Gen mit einer SLR von mindestens 1 nicht berücksichtigt wurde, wie hoch die absolute Signalstärke auf den Baseline-Arrays war, ebenso ob das Gen auf diesen als „absent“ oder „present“ erkannt wurde. Hier war stattdessen wichtig, dass das Gen auf den Experiment-Arrays eine Signalstärke über 50 aufwies und bei mindestens 2/3 der Experiment-Arrays als „present“ detektiert wurde. Darüber hinaus durfte für das Gen bei den Batchanalysen nicht in weniger als 2/3 der Vergleiche ein „increase“ angegeben werden und die SLR Low als eine Art Streuungsmaß nicht unter der Hälfte der minimalen SLR liegen, also nicht unter 0.5.

Bei herunterregulierten Genen:

- Signalstärke des Baseline-Arrays ≥ 50
- Signal Log Ratio ≤ -1
- Change ≤ -0.66
- Detection des Baseline-Arrays ≥ 0.66
- Signal Log Ratio High ≤ -0.5

Dies heißt hier, dass bei einem herunterregulierten Gen mit einer SLR von ≤ -1 nicht berücksichtigt wurde, wie hoch die absolute Signalstärke auf den Experiment-Arrays war, ebenso ob das Gen auf diesen als „absent“ oder „present“ erkannt wurde. Hier war diesmal ausschlaggebend, dass das Gen auf den Baseline-Arrays eine Signalstärke über 50 aufwies und bei mindestens 2/3 der Baseline-Arrays als „present“ detektiert wurde. Darüber hinaus durfte das Gen wie oben bei den Batchanalysen nicht in weniger als 2/3 der Vergleiche ein

„increase“ aufweisen, und die SLR Low als eine Art Streuungsmaß nicht unter der Hälfte der minimalen SLR liegen, also nicht unter 0.5.

Um auf ähnliche Weise regulierte Gene gruppieren zu können, wurden die Versuchsgruppenmittelwerte der Signalstärken aller Gene, die in mindestens einem Vergleich differentiell exprimiert waren, mit der Software Genesis (Institute for Genomics and Bioinformatics - Graz University of Technology, <http://genome.tugraz.at/Software/>; Sturn, Quackenbush & Trajanoski 2002) auf einen Bereich von -2 bis +2 normalisiert. Anschließend wurden aus den normalisierten Werten durch das Verfahren der Self Organising Maps (SOM) 12 Cluster jeweils ähnlich regulierter Gene berechnet. Folgende Einstellungen wurden hierzu verwendet:

Dimension X:	3	Initialization:	Random Genes
Dimension Y:	4	Neighborhood:	Bubble
Iterations:	2000	Topology:	Hexagonal
Alpha:	0.05		
Radius:	3		

Um die gemeinsame Regulierung der Expression funktionell verbundener Gene zu untersuchen, wurden weitere Auswertungen mit Ingenuity Pathway Analysis 3.1 (IPS, www.ingenuity.com) durchgeführt (Schoch *et al.* 2004). Hierzu erfolgte eine Verarbeitung der Rohdaten der Microarrays zunächst mittels der Software ArrayAssist von Affymetrix. Nach einem Clustering aller Microarrays nach ihrem globalen Expressionsverhalten wurden mehrere Microarrays aus der Auswertung ausgeschlossen, die zu stark von den anderen Arrays derselben Versuchsgruppe abwichen.

Letztlich blieben 22 Microarrays in der Analyse:

Gruppe 1:	BALB/c nach Scheinbehandlung	n = 3
Gruppe 2:	Resistente nach Scheinbehandlung	n = 2
Gruppe 3:	unbehandelte BALB/c	n = 4
Gruppe 4:	unbehandelte Resistente	n = 5
Gruppe 5:	BALB/c nach Mikrofilarieninjektion	n = 3
Gruppe 6:	Resistente nach Mikrofilarieninjektion	n = 5

Es wurden die gleichen Vergleiche wie mit der MAS durchgeführt. IPS berechnet eine Anzahl verschiedener funktioneller Gennetzwerke, in dieser Arbeit wird für jeden Vergleich immer das Netzwerk mit der höchsten Anzahl differenziell regulierter Gene wiedergegeben. Die Kriterien für eine differenzielle Genexpression sind hier eine SLR von > 1 bzw. < -1 , sowie ein $p < 0.05$.

2.16.2 Genexpression nach Implantation adulter Weibchen

2.16.2.1 Versuchstiere

In diesem Experiment wurden männliche, heterozygot resistente N15- bzw. suszeptible N14F3-Mäuse im Alter von ca. 6 bis 8 Wochen mit 3 verschiedenen Vorbehandlungen (Mikrofilarieninjektion, Mikrofilarieninjektion nach Scheinimplantation, Mikrofilarieninjektion nach Adultweibchenimplantation) verwendet. Folgende Tierzahlen wurden jeweils eingesetzt:

- Mikrofilarieninjektion: 5 Suszeptible und 5 Resistente
- Mikrofilarieninjektion nach Scheinimplantation: 4 Suszeptible und 3 Resistente
- Mikrofilarieninjektion nach Adultweibchenimplantation: 5 Suszeptible und 5 Resistente

Insgesamt wurden hierfür also 27 Microarrayexperimente durchgeführt.

2.16.2.2 Lungenentnahme und Probenaufarbeitung

Die Entnahme und Transport der Lungen erfolgte wie für das 1. Experiment beschrieben. Bei diesem Versuch wurden MG 430 V2 Oligonukleotid-Microarrays von Affymetrix eingesetzt mit ca. 45 000 Probe Sets, mit denen annähernd das gesamte Mausgenom erfasst ist.

2.16.2.3 Auswertung der Microarrays

Die Bildverarbeitung sowie Berechnung der Signalstärken und weiterer Parameter sowie die Berechnung von Signal Log Ratios erfolgte hier direkt mit ArrayAssist. In diese Auswertung gingen alle o. g. Microarrays ein. Zur Normalisierung wurden alle Arrays auf die 5 Arrays der suszeptiblen Tiere nach Mikrofilarieninjektion als Baseline bezogen.

Folgende Vergleiche wurden berechnet:

- Resistente nach Mikrofilarieninjektion vs. entsprechende BALB/c
- Resistente nach Mikrofilarieninjektion und Scheinimplantation vs. entsprechende BALB/c
- Resistente nach Mikrofilarieninjektion und Adultweibchenimplantation vs. entsprechende BALB/c
- Resistente nach Mikrofilarieninjektion und Scheinimplantation vs. Resistente nach Mikrofilarieninjektion
- Mikrofilarieninjektion und Adultweibchenimplantation vs. Resistente nach Mikrofilarieninjektion und Scheinimplantation

Auch hier erfolgten Netzwerkanalysen wie oben für das 1. Experiment beschrieben.

2.17 Zelluläre und humorale Blutparameter

2.17.1 Bestimmung der Leukozyten- und Eosinophilendichten

Zur Bestimmung der Leukozytendichte wurden je 5 µl heparinisiertes Blut 1:10 mit Türkscher Lösung (0.5 % w/v) in einem 0.5 ml-Reaktionsgefäß verdünnt und die Leukozyten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Zur Bestimmung der Eosinophilendichte wurden 5 µl heparinisiertes Blut 1:10 mit einer 0.1%igen Phloxin-B-Lösung (in 50%igem Propylenglykol) in einem 0.5 ml-Reaktionsgefäß

verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Mischung wurde auf eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer aufgetragen und für 10 Minuten zur Sedimentation der Zellen mit einem Kunststoffdeckel abgedeckt stehen gelassen. Anschließend wurden die dann orangerot gefärbten Eosinophilen ausgezählt.

2.17.2 FACS, Bioplex-Assay und ELISA

Den Versuchstieren wurden je 500 µl Blut entnommen, in 1 ml-Schraubdeckelgefäßen mit 10 µl Heparin-Natrium aufgefangen und zur weiteren Verarbeitung unter standardisierten Bedingungen (Gailus-Durner *et al.* 2005) an die German Mouse Clinic der GSF, Neuherberg, geschickt.

2.17.2.1 FACS-Analysen

In der GSF erfolgte zunächst zur Isolierung von Leukozyten direkt in 96-Well-Mikrotiter-Platten eine Erythrozytenlyse mittels NH_4Cl (0.17 M)-Trispuffer (pH 7.45). Nach einem Waschschrift mit FACS-Färbepuffer (PBS, 0.5 % BSA, 0.02 % Natriumazid, pH 7.45) wurden die Leukozyten 20 Minuten mit einem anti-Fc-Rezeptor-Antikörper (Klon 2.4G2, PharMingen, San Diego) 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 Tabelle 2.9.

Die Analyse der gefärbten Zellsuspensionen erfolgte in einem Cyan-Durchflusszytometer (DakoCytomation), die Verarbeitung der Daten mit der Software FlowJo (TreeStar Inc., USA). Alle Messungen wurden bis zum Erreichen von 25 000 Ereignissen durchgeführt.

Oberflächenmarker	Zelltyp	Klon
CD3 ⁺	T-Zellen	145-2C11
CD4 ⁺	T _H	RM4-5
CD4 ⁺ CD25 ⁺ (= IL2 α)	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 ⁺ CD44 ⁺	aktivierte/Memory-T _H	RM4-5; IM7
CD4 ⁺ CD44 ⁻	naive T _H	RM4-5; IM7
CD4 ⁺ Ly6c ⁻	naive T _H	RM4-5; AL-21
CD4 ⁺ Ly6c ⁺	aktivierte/Memory-T _H	RM4-5; AL-21
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
Gr1 ⁺ (= CD97)	Granulozyten, aktivierte T- und B-Zellen	RB6-8C5
Gr1 ⁺ CD11b ⁺	Granulozyten	RB6-8C5; M1/70
CD11b ⁺ Gr1 ⁻	Monozyten	M1/70
CD49b ⁺	NK-Zellen	DX5 ⁺
CD49b ⁺ CD3 ⁺	NK-T-Zellen	DX5 ⁺

Tab. 2.9: Übersicht über die in den FACS-Analysen gemessenen zellulären Parametern.

2.17.2.2 Bioplex-Assay zum Nachweis unspezifischer Immunglobuline

Die Bestimmung der Plasmakonzentrationen unspezifischer Antikörper der Klassen und Subklassen IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM und IgA wurde für alle Antikörper simultan in der selben Probe mittels eines Bioplex-Bead-Assays (Biorad, Hercules) durchgeführt. Hierbei werden monoklonale Antikörper eingesetzt, die an Beads mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert sind. Es werden sämtliche Antikörperklassen simultan in derselben Probe untersucht. Die Bestimmung der Immunglobulinkonzentrationen erfolgt dann in einem Bioplex-Reader.

2.17.2.3 ELISA zur semiquantitativen Messung von Rheumafaktor und anti-DNA-Antikörpern

Der Nachweis von Rheumafaktor und anti-DNA-Antikörpern erfolgte mittels indirektem ELISA mit IgG (rabbit, Sigma-Aldrich, Steinheim) und Kälberthymus-DNA (Sigma-Aldrich) als Antigene and AP-konjugiertem Sekundärantikörper (goat anti-mouse, Sigma-Aldrich). Serumproben von MRL/MpJ-*Tnfrsf6^{lpr}*-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor) wurden als Positivkontrollen für den Autoantikörperassay verwendet. Die Bestimmung der Antikörperkonzentrationen erfolgte über photometrische Messungen.

2.18 Allgemeine statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung anderer Versuche als der Genexpressions- sowie der Genomanalysen wurden die Softwareprogramme Microsoft Excel XP und WinSTAT 3.0 verwendet. Zur Bildung von Mittelwerten wurde das arithmetische Mittel, als Streuungsmaß die Standardabweichung berechnet.

Die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte für die Mikrofilarieninjektionsexperimente sowie die Infektionen mit L3 mittels des Mann-Whitney(U)-Testes. Als signifikant wurden Unterschiede zwischen Gruppen betrachtet, wenn die beidseitige Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0.05 war.

Zur Auswertung der FACS- und Immunglobulin-Analysen wurde zunächst mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Lag eine solche vor, wurde mittels des F-Tests auf homogene oder heterogene Varianzen getestet. Signifikante Unterschiede wurden dann durch den Student-T-Test ermittelt ($p < 0.05$).

Die Übereinstimmung der bei den Kreuzungsversuchen ermittelten Zahlenverhältnisse von empfänglichen und resistenten Tieren mit den nach den Mendelschen Regeln zu erwartenden Verhältnissen wurde mit einem Binomialtest überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Parasitologische Experimente

Aus den Inzuchtstämmen DBA/1 und BALB/c sollten durch serielle Rückkreuzung zu BALB/c kongene Mäuse gezüchtet werden, die sich von diesen durch Resistenz gegen intravenös injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis* unterscheiden. Daher wurden in jeder Generation Mikrofilarieninjektionen durchgeführt, um die jeweils zur Zucht benötigten (heterozygot) resistenten Nachkommen zu selektieren.

Mit hierbei erzielten kongenen resistenten und suszeptiblen sowie BALB/c-Mäusen wurden dann weitere Infektionsexperimente auch mit anderen Parasitenstadien (L3, L4 und Adultwürmern) durchgeführt.

Außerdem wurden verschiedene Versuche zur Übertragbarkeit von Resistenzfaktoren *via* Milch, Blut oder Plasma, zum vakzinierenden Einfluss mehrfacher Mikrofilarieninjektionen, zur Auswirkung nacheinander folgender L3- und Mikrofilarien-, L4- und Mikrofilarien- sowie Adultwurm- und Mikrofilarieninfektionen durchgeführt.

3.1.1 Mikrofilarieninjektionen

3.1.1.1 Mikrofilariämien verschiedener Rückkreuzungsgenerationen

Bei den ersten Experimenten wurden je 100 000 Mikrofilarien pro Maus injiziert, bei späteren Experimenten meist 50 000. Erste Kreuzungsexperimente und Mikrofilarieninjektionen bis Generation N3 wurden bereits bei Bereth (2000) vorgestellt. Da später DNA von Tieren der F1 und anderen niederen Generationen zur Genomanalyse benötigt wurde, die aus früheren Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung stand, wurden auch diese Generationen nochmals nachgezüchtet und in Mikrofilarieninjektionsexperimente einbezogen. Der Verlauf des Mikrofilarienabbaus in den Parentalstämmen DBA/1 und BALB/c ist in Abbildung 3.1 wiedergegeben:

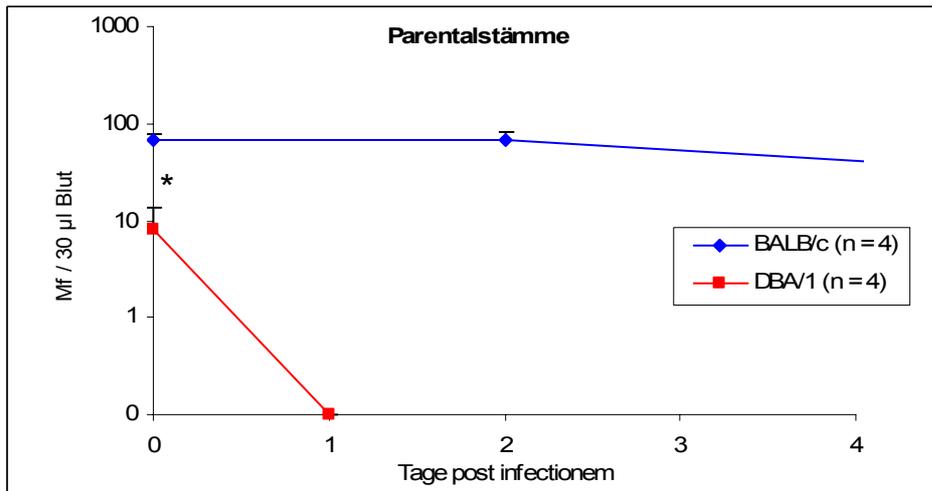


Abb. 3.1: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von DBA/1- und BALB/c-Mäusen nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien. *: $p = 0.02$.

Bereits zwei Stunden nach der Injektion der Mikrofilarien lagen die Mikrofilariendichten bei DBA/1-Mäusen signifikant unter denen von BALB/c-Mäusen. In BALB/c-Mäusen zirkulierten die injizierten Mikrofilarien mehrere Wochen im peripheren Blut, bei DBA/1-Mäusen hingegen waren bereits einen Tag nach der Injektion keine Mikrofilarien mehr nachzuweisen. Die Zeitspanne, die BALB/c-Mäuse bis zur Eliminierung der Mikrofilarien benötigen, liegt etwa zwischen frühestens zehn Tagen und vereinzelt bis zu sechs Wochen. Als Kriterium für die Resistenz von Labormäusen aus Kreuzungen mit DBA/1 gegenüber injizierten Mikrofilarien gilt im Folgenden, dass vier Tage nach der Injektion keine Mikrofilarien mehr in einer Blutprobe von 30 µl nachweisbar sein durften. Zu diesem Zeitpunkt waren alle DBA/1-Mäuse mikrofilarienneutral, alle BALB/c-Mäuse hingegen eindeutig mikrofilarienpositiv, es gab diesbezüglich keine Überschneidungen. Entsprechend sind die Mikrofilariämien im Folgenden meist nur bis zum vierten Tag nach dem Eingriff dargestellt, da dies der für Unterschiede in der innate Immunantwort resistenter sowie suszeptibler Mäuse ausschlaggebende Zeitraum ist. „Resistenz“ bezeichnet im Folgenden so weit nicht anders angegeben die Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien.

Die Verpaarung von BALB/c-Männchen mit DBA/1-Weibchen erbrachte eine F1, deren Mikrofilariämie in Abbildung 3.2 dargestellt ist.

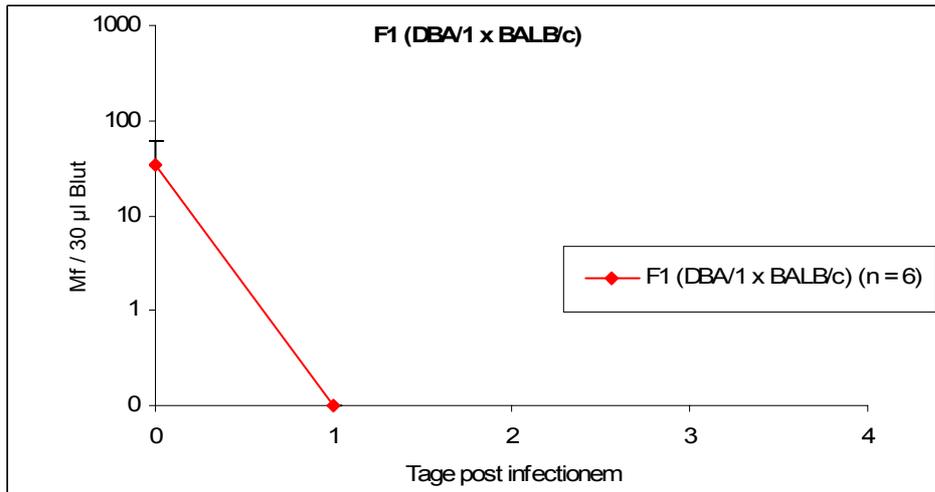


Abb. 3.2: Mikrofilarämie (a. M. + SD) von F1-Nachkommen der Kreuzung DBA/1 x BALB/c nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Die F1-Nachkommen aus der Kreuzung von BALB/c und DBA/1 waren uniform resistent. Sie zeigten einen ebenso raschen Abbau der injizierten Mikrofilarien wie DBA/1-Mäuse, wengleich bei ihnen der Startwert zwei Stunden nach der Injektion höher lag als bei DBA/1-Mäusen.

Die F1-Nachkommen wurden mit BALB/c-Mäusen rückgekreuzt. In jeder der folgenden Generationen wurden durch Mikrofilarieninjektionen die resistenten Nachkommen ermittelt und entsprechend wieder mit BALB/c-Mäusen verpaart. Die Mikrofilarämien der Generationen N2 bis N7 sind in Abbildung 3.3 wiedergegeben. Die Grafik zur N3 ist hierbei der Arbeit von Bereth (2000) entnommen, die Grafiken zu den Mikrofilarämien der Generationen N4 bis N7 entstammen meiner eigenen Diplomarbeit (Schumacher 2002).

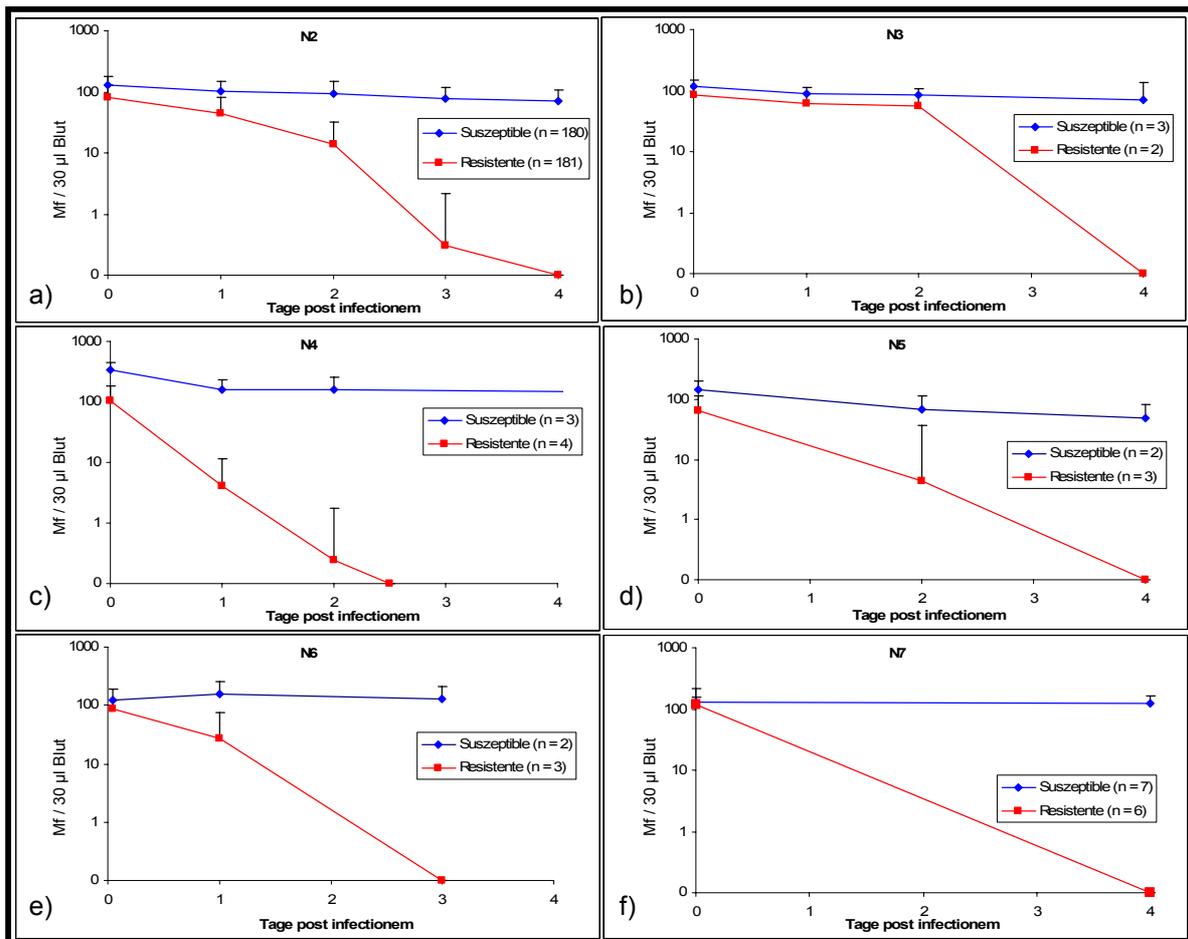


Abb. 3.3: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration a) N2, b) N3, c) N4, d) N5, e) N6, f) N7 nach intravenöser Injektion von a), f) 50 000 bzw. b), c), d), e) 100 000 Mikrofilarien. b) verändert nach Bereth (2000), c), d), e), f) verändert nach Schumacher (2002).

In jeder Generation zeigte sich eine Aufspaltung in resistente und susceptible Nachkommen näherungsweise im Verhältnis 1:1. In manchen Experimenten wurden nicht täglich Blutproben genommen, so dass länger andauernde Mikrofilariämien der resistenten Nachkommen auf fehlende Probennahmen zwischen dem Tag der Infektion und Tag 4 nach dem Eingriff zurückzuführen sein können. Jedoch zeigte keine Generation eine solch rasche Eliminierung der Mikrofilarien wie DBA/1-Mäuse bzw. die F1. Die resistenten Tiere der siebten Rückkreuzungsgeneration wurden untereinander verpaart, um homozygot resistente Mäuse mit weitestgehender genetischer Übereinstimmung zu BALB/c zu erzielen. Die Mikrofilariämie der Mäuse dieser N7F1 zeigt Abbildung 3.4.

Ergebnisse

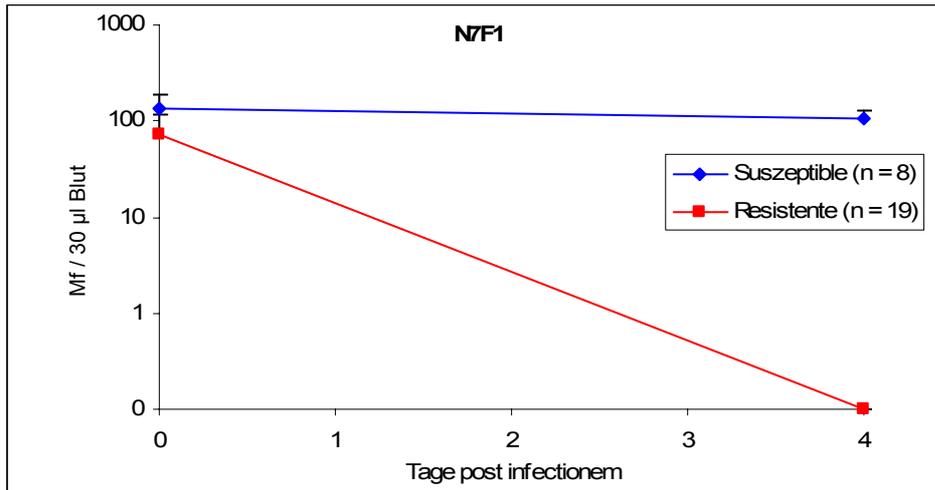


Abb. 3.4: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Generation N7F1 (N7 x N7) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien. Verändert nach Schumacher (2002).

Um homozygot und heterozygot resistente Tiere unterscheiden zu können, wurden resistente Mäuse der N7F1 mit BALB/c-Mäusen gekreuzt. Die Mikrofilariämien deren Nachkommen sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

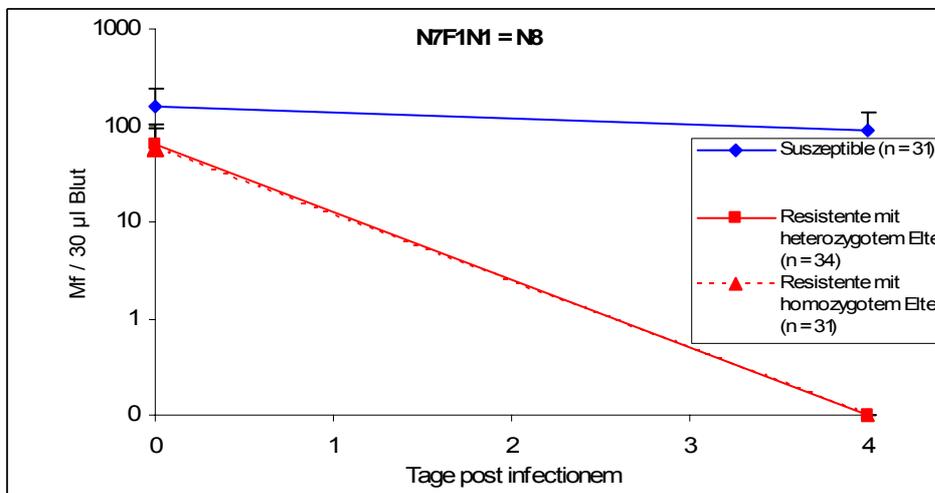


Abb. 3.5: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration N7F1N1 (entspricht N8) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien. Verändert nach Schumacher (2002).

Statt N7F1N1 und entsprechenden Bezeichnungen wird im Folgenden „N8“ usw. verwendet, da die Anzahl der Rückkreuzungen und nicht der Inzuchtgenerationen entscheidend für den Grad der genetischen Übereinstimmung mit BALB/c ist. In der N8 fanden sich Würfe, die wie zuvor eine Aufspaltung in resistente und suszeptible Nachkommen annähernd im Verhältnis

1:1 aufwiesen (insgesamt 31 suszeptible gegenüber 34 resistenten Mäusen). Ein Teil der Würfe war jedoch uniform resistent, so dass deren N7F1-Eltern als homozygot resistent eingestuft wurden. Voraussetzung hierfür waren wenigstens vier uniform resistente Nachkommen, was mit 94%iger Sicherheit auf einen homozygot resistenten Elter schließen lässt. Retrospektiv ergaben sich aus den Infektionsexperimenten mit Mäusen der N8 für die Tiere der N7 folgende Verhältnisse (Abbildung 3.6):

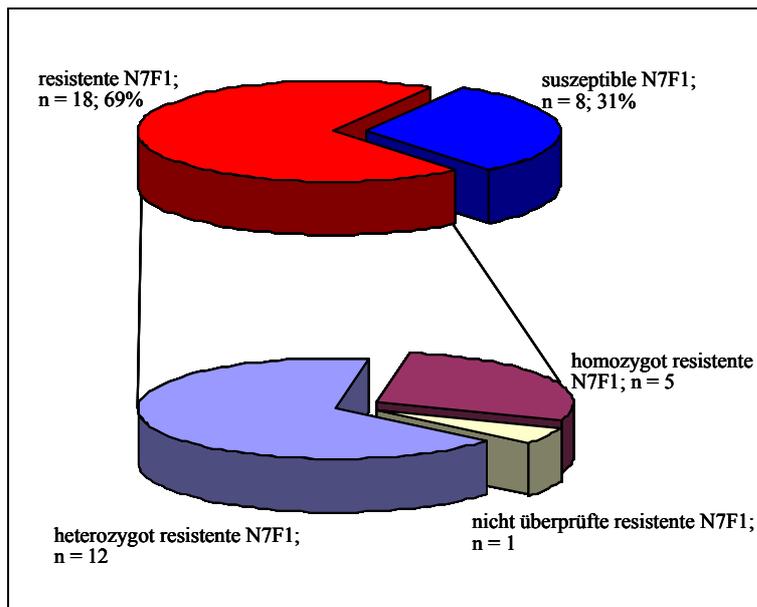


Abb. 3.6: Aufspaltung der Generation N7F1 (N7 x N7) in suszeptible bzw. resistente Tiere sowie weitere Aufspaltung der resistenten in homozygote und heterozygote.

69 % aller Tiere der N7F1 waren resistent, von den hiervon durch Rückkreuzung überprüften Tieren waren 5 homozygot, 12 heterozygot resistent. Basierend auf den homozygoten Mäusen wurde ein neuer Mäusestamm etabliert, der im Folgenden durch Bruder-Schwester-Verpaarungen fortgesetzt wurde. Ein Teil der Experimente zur Genexpression sowie verschiedene weitere parasitologische Untersuchungen wurden mit Mäusen dieses 7 Generationen rückgekreuzten, homozygot resistenten Stammes durchgeführt, der rein rechnerisch eine 99.2%ige genetische Übereinstimmung mit BALB/c und an 98.4 % aller Genloci Homozygotie aufweist. Für die Ermittlung des Mikrofilariämieresistenzlocus wurden weitere Rückkreuzungen durchgeführt, um den Anteil des DBA/1-Genoms noch weiter zu verringern und soweit praktisch möglich tatsächlich zu BALB/c kongene Tiere zu erzielen. Hierzu wurden homozygot resistente Tiere sowie die resistenten Nachkommen der folgenden Rückkreuzungsgenerationen zum Ausschluss geschlechtsspezifischer Faktoren der Resistenz

Ergebnisse

diesmal mit BALB/c-Weibchen rückgekreuzt. Die Mikrofilariämien von Mäusen der Generationen N9 bis N14 zeigt Abbildung 3.7.

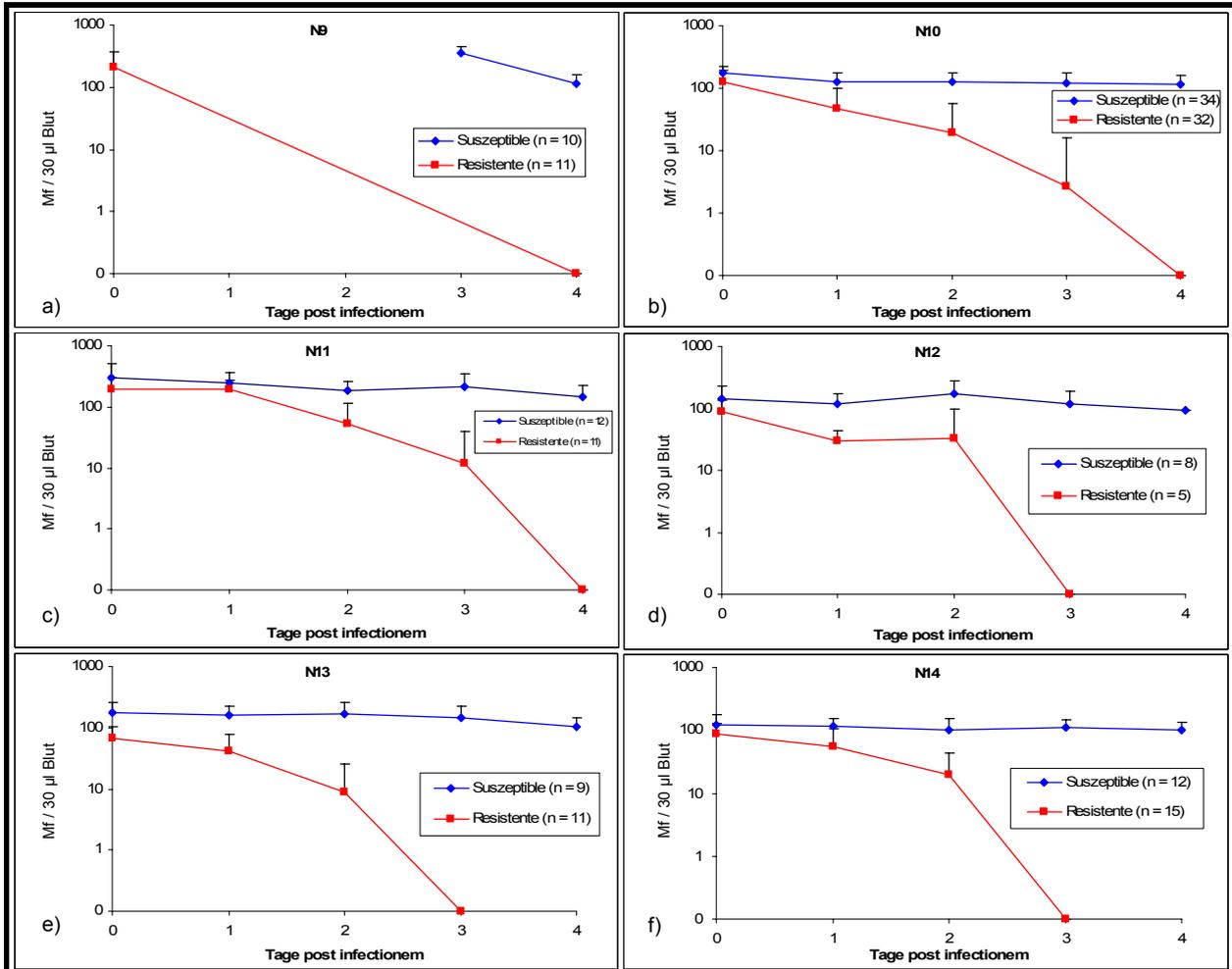


Abb. 3.7: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgenerationen a) N9, b) N10, c) N11, d) N12, e) N13, f) N14 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Wieder spalteten alle Generationen in näherungsweise je 50 % resistente und suszeptible Tiere auf. Die resistenten Mäuse waren wieder im arithmetischen Mittel etwas länger mikrofilarienpositiv als DBA/1- bzw. F1-Mäuse. Wie bei der N7 wurden resistente Mäuse der N14 untereinander verpaart, um homozygot resistente N14F1-Tiere zu erhalten. Die Mikrofilariämien von Tieren dieser Generation zeigt Abbildung 3.8.

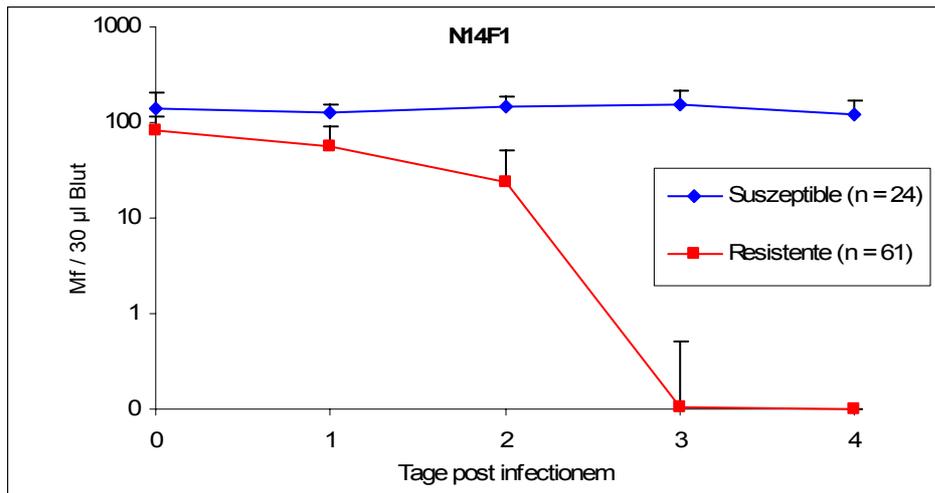


Abb. 3.8: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Generation N14F1 (N14 x N14) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Um die homozygot resistenten Tiere in der N14F1 zu ermitteln, wurden wieder Testrückkreuzungen mit BALB/c-Mäusen durchgeführt. Die Nachkommen, also die N14F1N1, die im Folgenden wie oben entsprechend als N15 bezeichnet wird, entstammten wieder teils uniform resistenten, teils aufspaltenden Würfen (Abbildung 3.9).

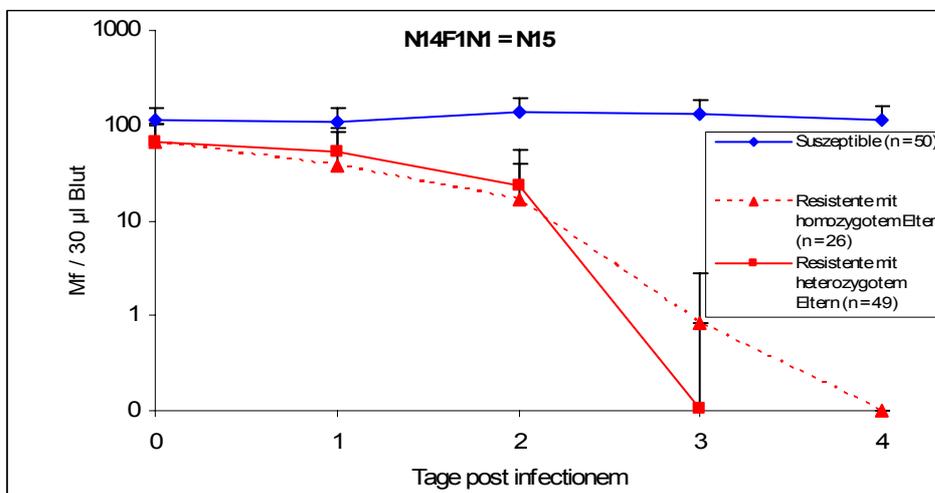


Abb. 3.9: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration N14F1N1 (entspricht N15) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

In den aufspaltenden Würfen fanden sich wieder annähernd je 50 % resistente und suszeptible Nachkommen (49 bzw. 50). Aus dem Phänotyp ihrer Nachkommen in der N15 wurde wieder retrospektiv auf den Genotyp der resistenten Mäuse der N14 geschlossen, die Aufspaltungsverhältnisse sind Abbildung 3.10 zu entnehmen.

Ergebnisse

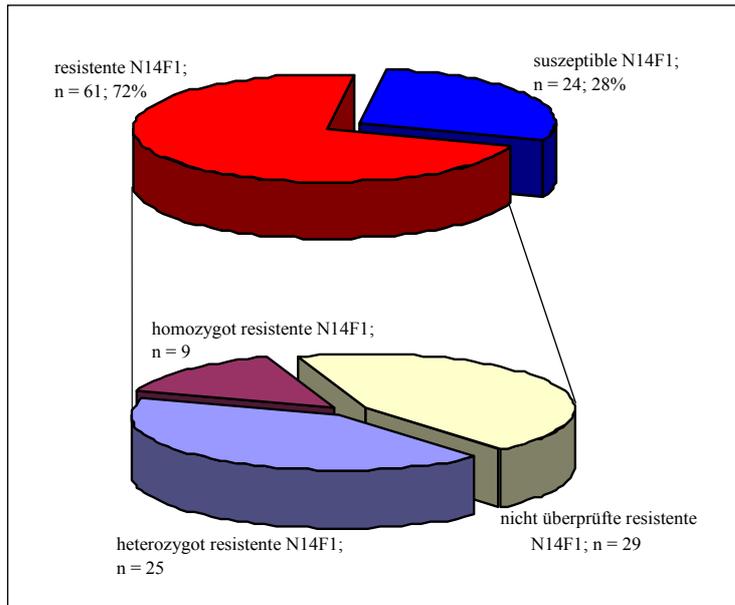


Abb. 3.10: Aufspaltung der Generation N14F1 (N14 x N14) in susceptible bzw. resistente Tiere sowie weitere Aufspaltung der resistenten in homozygote und heterozygote.

Auch basierend auf der N14 wurden weitere Rückkreuzungsexperimente durchgeführt, um den Anteil DBA/1-Genom noch weiter zu verringern (Abbildungen 3.11 bis 3.13), weitere parasitologische und immunologische Untersuchungen sowie Genexpressionsanalysen wurden mit homozygot resistenten N14Fx-Mäusen bzw. heterozygot resistenten Mäusen aus Verpaarungen sicher homozygoter Tiere mit BALB/c-Mäusen durchgeführt.

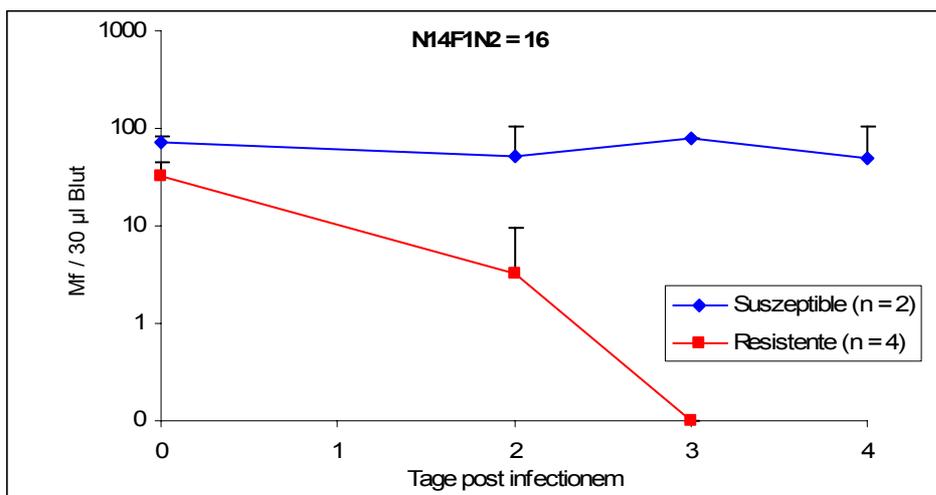


Abb. 3.11: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration N16 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

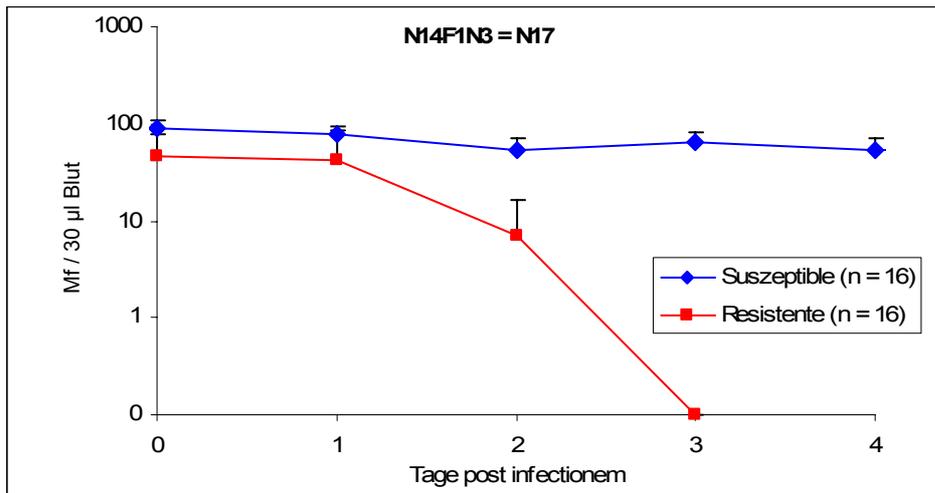


Abb. 3.12: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration N17 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

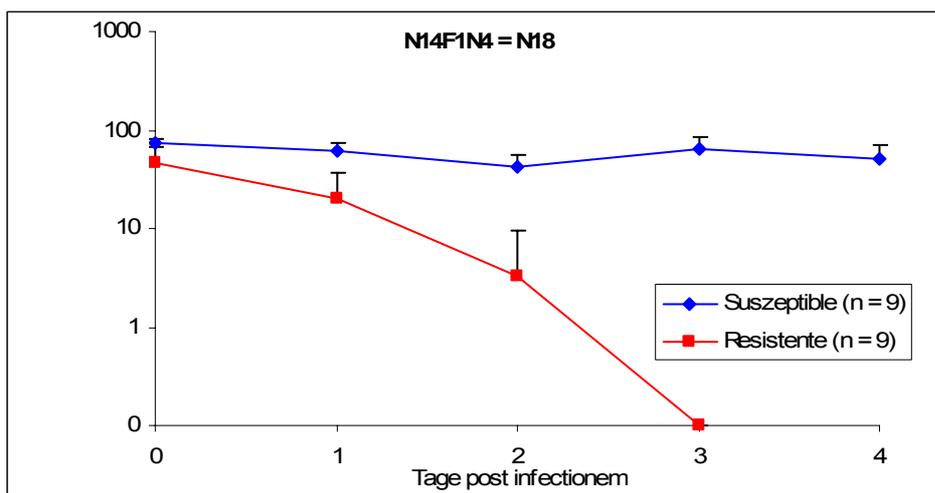


Abb. 3.13: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Rückkreuzungsgeneration N18 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Die Generationen N16 bis N18 spalteten wieder näherungsweise bzw. exakt 1:1 in resistente und suszeptible Tiere auf, und wieder dauerten die Mikrofilariämien der resistenten Mäuse im arithmetischen Mittel bis Tag drei nach der Infektion an, also länger als bei DBA/1- oder F1-Mäusen.

Die beobachteten Spaltungsverhältnisse von F1 bis N18 entsprechen einem autosomal monogenen, dominanten Erbgang für die Resistenz. Unter der Annahme eines Mendelschen Erbgangs gibt Tabelle 3.1 die tatsächlich beobachteten sowie die nach Mendel und nach dem Binomialtest zu erwartenden Anteile resistenter und suszeptibler Mäuse in jeder Generation an.

Generation	n (gesamt)	nach Mendel erwartet		beobachtet		Binomialtest Referenzbereich (Resistente)	beobachtet	
		% (Resistente)	% (Suszeptible)	% (Resistente)	% (Suszeptible)		n (Resistente)	n (Suszeptible)
P (BALB/c)	8	0	100	0	100	—	0	8
P (DBA/1)	10	100	0	100	0	—	10	0
F1	12	100	0	100	0	—	12	0
N2	361	50	50	50	50	—	181	180
N3	5	50	50	40	60	0 - 4	2	3
N4	7	50	50	57	43	1 - 5	4	3
N5	5	50	50	60	40	0 - 4	3	2
N6	5	50	50	60	40	0 - 4	3	2
N7	13	50	50	54	46	3 - 9	7	6
N7F1	27	75	25	70	30	16 - 23	19	8
N8	65	50	50	52	48	25 - 39	34	31
N9	21	50	50	52	48	6 - 14	11	10
N10	66	50	50	48	52	25 - 40	32	34
N11	23	50	50	48	52	7 - 15	11	12
N12	13	50	50	38	62	3 - 9	5	8
N13	20	50	50	55	45	6 - 13	11	9
N14	27	50	50	56	44	8 - 18	15	12
N14F1	85	75	25	72	28	56 - 70	61	24
N15	99	50	50	49	51	40 - 58	49	50
N16	6	50	50	67	33	1 - 4	4	2
N17	32	50	50	50	50	10 - 21	16	16
N18	18	50	50	50	50	5 - 12	9	9

Tab. 3.1: Übersicht über die Gesamtzahl aller Tiere jeder (Rückkreuzungs-)Generation sowie über die tatsächlich beobachteten, die nach Mendel sowie die nach dem Binomialtest zu erwartenden Anteile resistenter und suszeptibler Mäuse.

Aufspaltung der Resistenten in verschiedene Untergruppen

Um einen möglichen modulatorischen Einfluss weiterer Gene beurteilen zu können, wurden in verschiedenen Generationen mit ausreichendem Stichprobenumfang nur die resistenten Tiere nach der Geschwindigkeit des Abbaus injizierter Mikrofilarien gruppiert und signifikante Unterschiede berechnet (Abbildungen 3.14 bis 3.17).

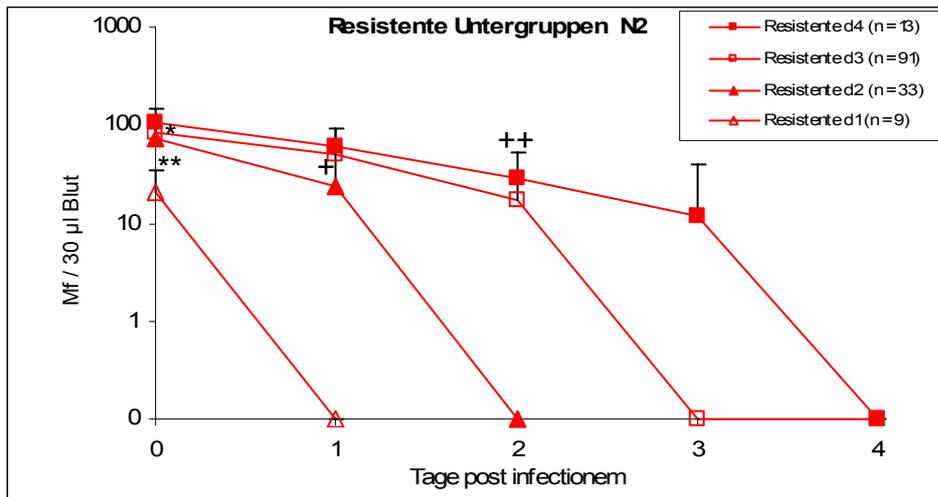


Abb. 3.14: Mikrofilariämie (a. M. + SD) der resistenten Tiere der Rückkreuzungsgeneration N2 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien, nach der Geschwindigkeit des Mikrofilarienabbaus in Gruppen unterteilt. *: $p = 0.03$ (d3 gegenüber d4), **: $p = 0.0003$ (d1 gegenüber d2), +: $p = 0.00001$ (d4 gegenüber d2), ++: $p = 4 \times 10^{-14}$.

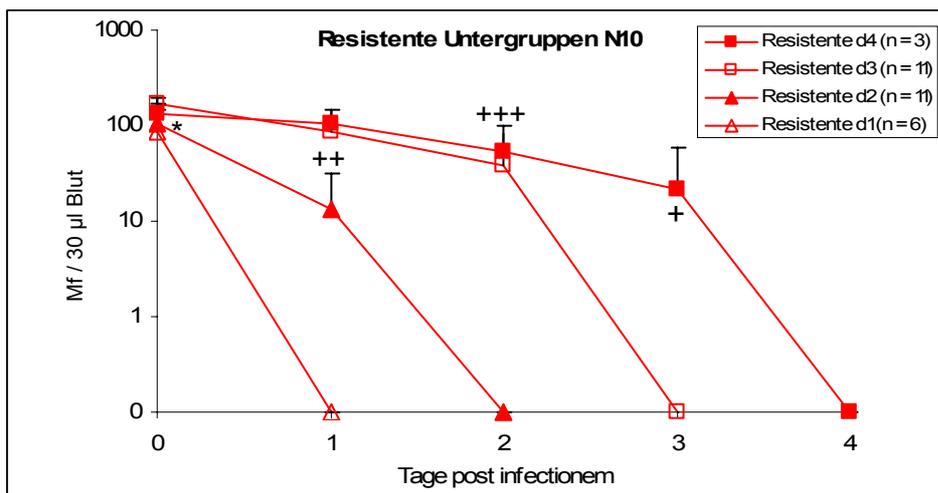


Abb. 3.15: Mikrofilariämie (a. M. + SD) der resistenten Tiere der Rückkreuzungsgeneration N10 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien, nach der Geschwindigkeit des Mikrofilarienabbaus in Gruppen unterteilt. *: $p = 0.01$ (d1 und d2 gegenüber d3), ++: $p = 0.0007$ (d3 gegenüber d2), +++: $p = 0.00002$ (d2 gegenüber d3), +: $p = 0.0002$.

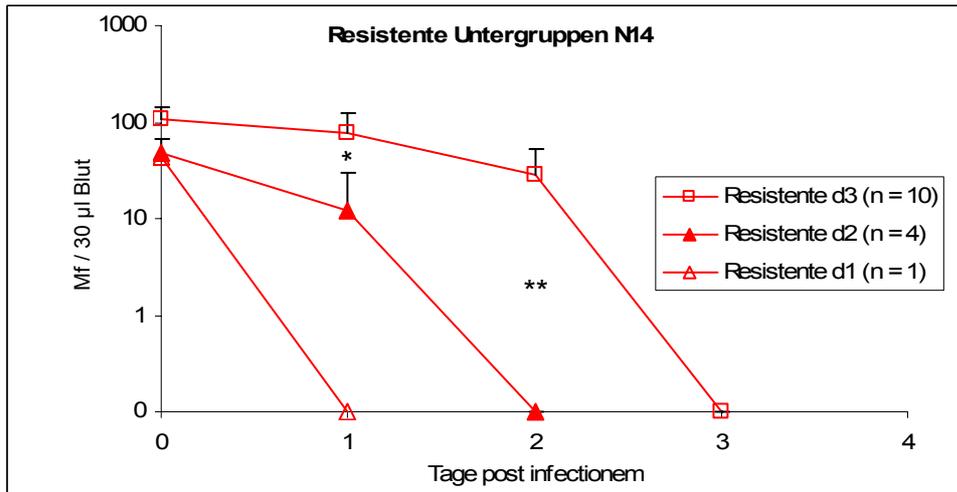


Abb. 3.16: Mikrofilariämie (a. M. + SD) der resistenten Tiere der Rückkreuzungsgeneration N14 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien, nach der Geschwindigkeit des Mikrofilarienabbaus in Gruppen unterteilt. *: $p = 0.007$ (d3 gegenüber d2), **: $p = 0.003$.

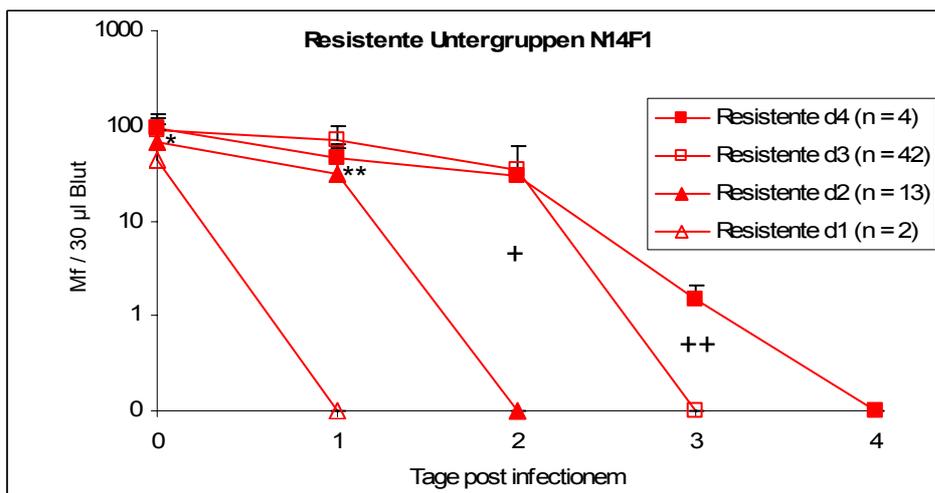


Abb. 3.17: Mikrofilariämie (a. M. + SD) der resistenten Tiere der Rückkreuzungsgeneration N10 nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien, nach der Geschwindigkeit des Mikrofilarienabbaus in Gruppen unterteilt. *: $p = 0.02$ (d2 gegenüber d3), **: $p = 0.0004$ (d2 gegenüber d3), +: $p = 1 \times 10^{-6}$ (d2 gegenüber d3), ++: $p = 3 \times 10^{-6}$.

In den Generationen N2, N10, N14 und N14F1 unterschieden sich die Mikrofilariämien resistenter Mäuse, die an Tag 1, Tag 2, Tag 3 oder erst Tag 4 *p. i.* mikrofilarienneutral waren, teils hoch signifikant.

Mikrofilarieninjektionen bei homozygot suszeptiblen Mäusen

Aus der Verpaarung suszeptibler N14-Mäuse hervorgegangene suszeptible Mäuse der N14F1 wurden mit Mikrofilarien infiziert (Abbildung 3.18).

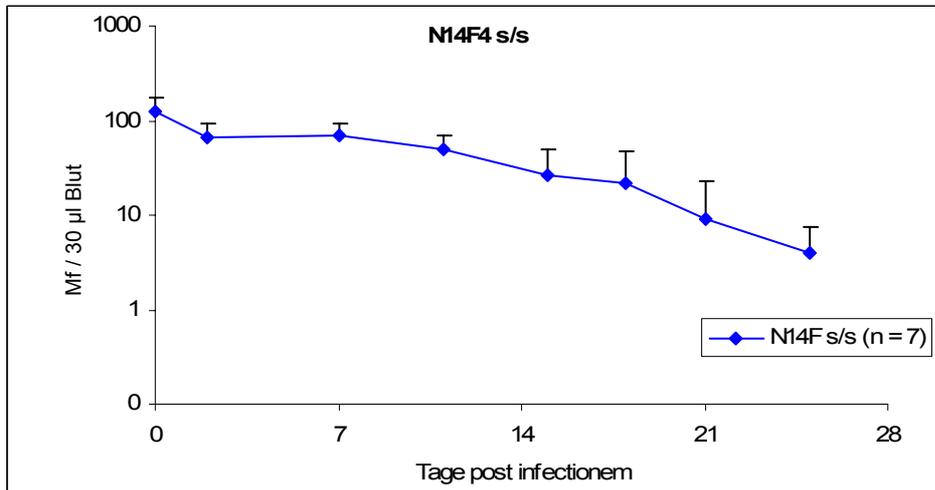


Abb. 3.18: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von N14F4-Mäusen des homozygot suszeptiblen Stammes nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Die Dynamik der Mikrofilarieneliminierung entsprach der von Tieren des Parentalstammes BALB/c, bis etwa vier Wochen *p. i.* waren im peripheren Blut zirkulierende Mikrofilarien nachweisbar. Mit diesen suszeptiblen Mäusen wurde ein homozygot suszeptibler Stamm begründet. Tiere dieses Stammes dienten in einigen der folgenden Experimente als Kontrollen zu resistenten Tieren.

3.1.1.2 Injektion verschiedener Mikrofilariendosen

In je drei BALB/c- und heterozygot resistente Mäuse wurden Mikrofilarien in Dosen von je 1000, 5000, 20 000 und 50 000 intravenös injiziert und eine Stunde *p. i.* die Mikrofilariendichten bestimmt (Abbildung 3.19).

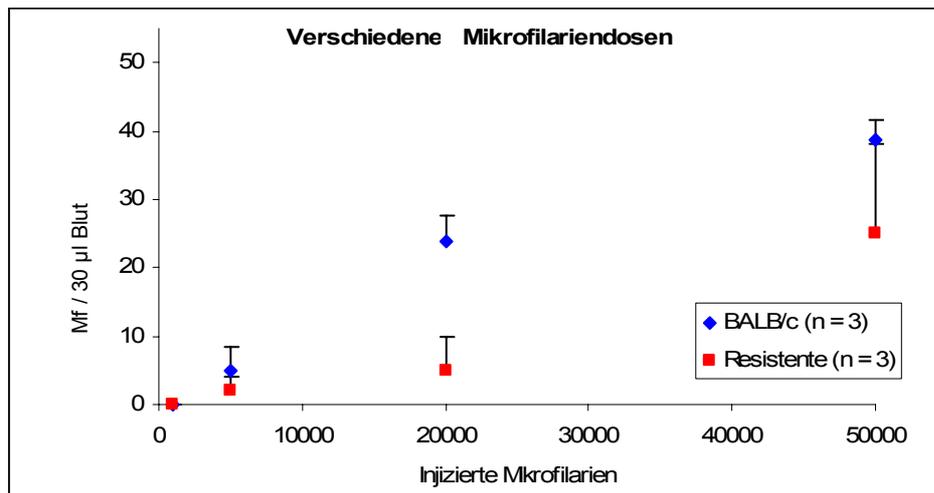


Abb. 3.19: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von resistenten N15- und BALB/c-Mäusen eine Stunde nach intravenöser Injektion von 1000, 5000, 20 000 bzw. 50 000 Mikrofilarien.

*: $p = 0.05$.

Bei einer Injektionsdosis von 1000 Mikrofilarien konnten anschließend keine Mikrofilarien im peripheren Blut nachgewiesen werden. Bei den anderen Infektionsdosen gelang der Nachweis, wobei die Mikrofilariendichten der BALB/c-Mäuse stets über denen der resistenten Mäuse lagen.

3.1.1.3 Intrapleurale Mikrofilarieninjektion

Das Habitat der Adultwürmer von *L. sigmodontis* ist die Pleura. Dort werden unter natürlichen Infektionsbedingungen auch die Mikrofilarien freigesetzt, bevor sie von dort *via* Lymphsystem über den Lungenkreislauf in das periphere Blut gelangen. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich die bei intravenöser Mikrofilarieninjektion beobachteten Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen auch bei Einbringen von Mikrofilarien direkt in die Pleura wieder finden lassen. Dazu wurden sechs suszeptiblen und sechs homozygot resistenten Mäusen jeweils 100 000 Mikrofilarien intrapleural injiziert (Abbildung 3.20).

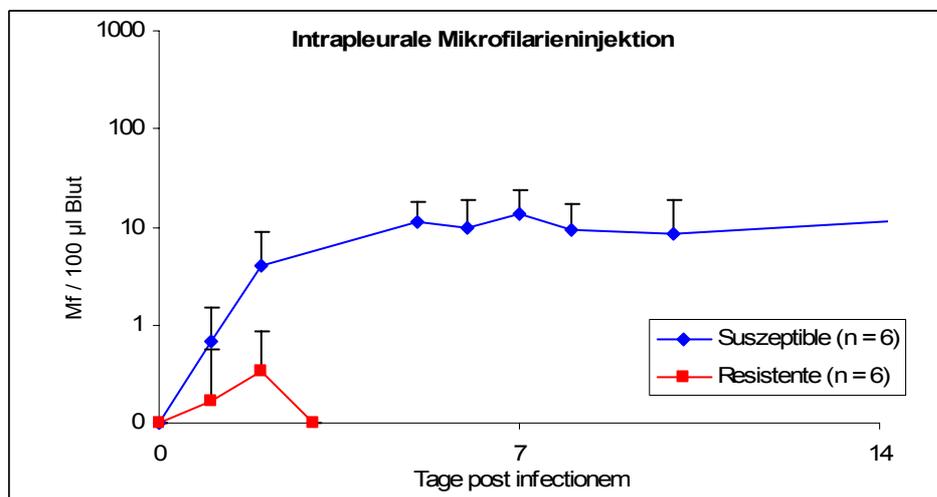


Abb. 3.20: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von resistenten N7F3- und suszeptiblen N7F4-Tieren nach intrapleuraler Injektion von 100 000 Mikrofilarien.

Ab Tag 5 *p. i.* waren bei sämtlichen suszeptiblen Mäusen Mikrofilarien im peripheren Blut nachweisbar. In der Gruppe der resistenten Tiere wies an Tag 1 *p. i.* nur ein Tier eine Mikrofilariendichte von einer Mikrofilarie in 100 µl Blut auf. An Tag 2 *p. i.* war nur bei zwei anderen resistenten Mäusen ebenfalls jeweils eine Mikrofilarie in 100 µl Blut nachweisbar. An Tag 3 *p. i.* waren alle Tiere dieser Gruppe mikrofilariennegativ.

3.1.1.4 Vakzinierung durch mehrfache Mikrofilarieninjektionen

Um die Induzierbarkeit der innate Immunantwort bzw. die Latenzzeit für eine adaptive Immunantwort zu untersuchen, wurden in je zehn susceptible und heterozygot resistente Mäuse 50 000 Mikrofilarien injiziert, drei Tage darauf erfolgte eine Zweitinjektion mit 100 000 Mikrofilarien. Die Mikrofilariämieverläufe beider Experimente sind in Abbildung 3.21 zusammengefasst.

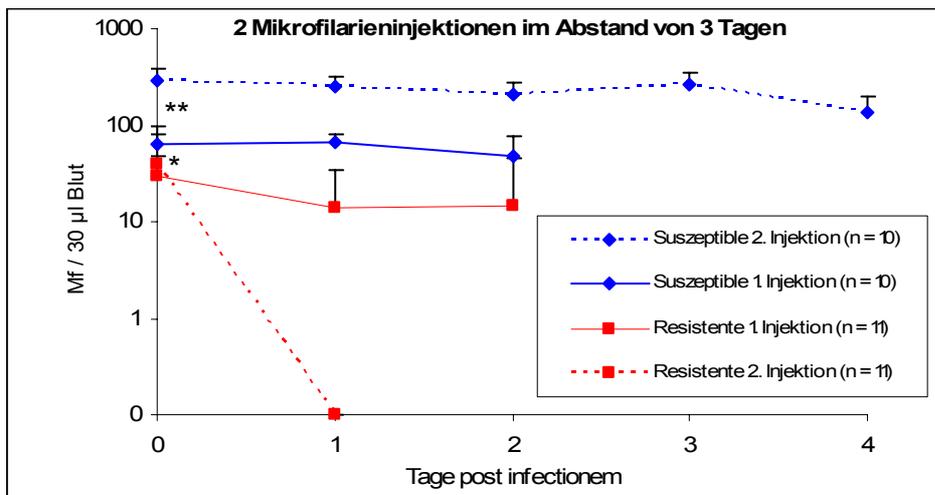


Abb. 3.21: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Mäusen der Rückkreuzungsgeneration N15 nach intravenöser Injektion von 50 000 sowie drei Tage später 100 000 Mikrofilarien. *: $p < 0.003$ (Resistente 1. gegenüber Suszeptible 1. Injektion sowie Resistente 1. gegenüber 2. Injektion); **: $p = 0.0002$ (Resistente 1. gegenüber 2. Injektion).

Bei den resistenten Tieren lag die Mikrofilariendichte zwei Stunden nach der Zweitinfektion signifikant unter dem entsprechenden Wert der Erstinfektion. Der Mikrofilarienabbau war stark beschleunigt, so dass einen Tag nach der Zweitinfektion alle resistenten Mäuse mikrofilarienneutral waren. Die Mikrofilariendichten der suszeptiblen Tiere lagen zwei Stunden nach der Zweitinfektion hoch signifikant über dem entsprechenden Wert der Erstinfektion. Der Mikrofilariämieverlauf der Zweitinfektion entsprach ansonsten dem einer Erstinfektion.

Ein entsprechendes Experiment mit einer Zweitinfektion im Abstand von sieben Tagen nach der Erstinfektion zeigt Abbildung 3.22:

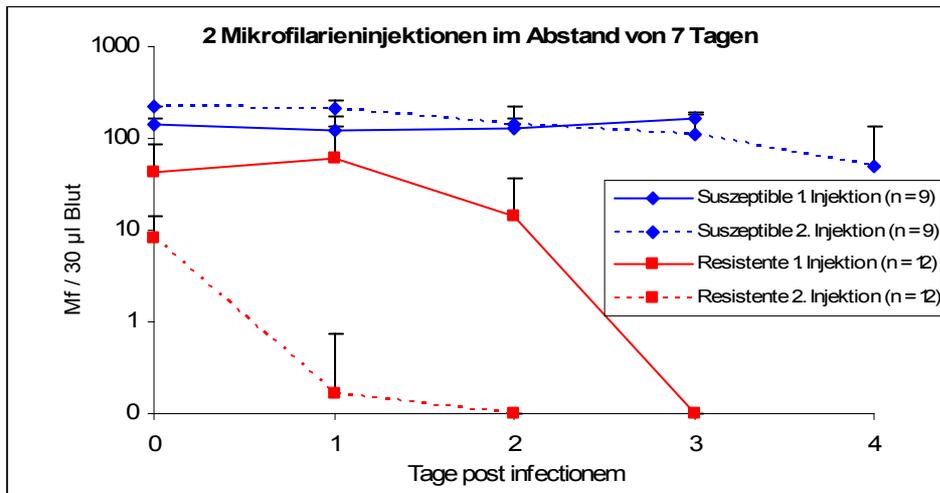


Abb. 3.22: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Mäusen der Rückkreuzungsgeneration N15 nach intravenöser Injektion von 50 000 sowie sieben Tage später 100 000 Mikrofilarien. *: $p = 0.01$ (Resistente 1. gegenüber 2. Injektion); **: $p = 0.002$ (Resistente 1. gegenüber 2. Injektion).

Bei resistenten Mäusen war wieder eine signifikant niedrigere Mikrofilariendichte zwei Stunden nach der Zweitinfektion gegenüber dem entsprechenden Wert nach der Erstinfektion zu beobachten. Der Mikrofilarienabbau war auch hier beschleunigt, so dass einen Tag nach der Zweitinfektion nur noch in einer resistenten Maus eine Mikrofilarie in 30 µl Blut nachgewiesen wurde. Der Mikrofilariämieverlauf suszeptibler Mäuse nach Zweitinfektion entsprach dem der Erstinfektion.

Da bei resistenten Tieren bereits drei Tage nach Erstinfektion eine Auswirkung auf den Verlauf einer Zweitinfektion zu beobachten war, bei suszeptiblen hingegen auch sieben Tage nach Erstinfektion kein solcher Effekt auftrat, wurden in einem weiteren Experiment nur in suszeptible Mäuse 39 Tage nach einer ersten Injektion von 50 000 Mikrofilarien erneut 50 000 Mikrofilarien intravenös injiziert und die Mikrofilariämieverläufe beobachtet (Abbildung 3.23).

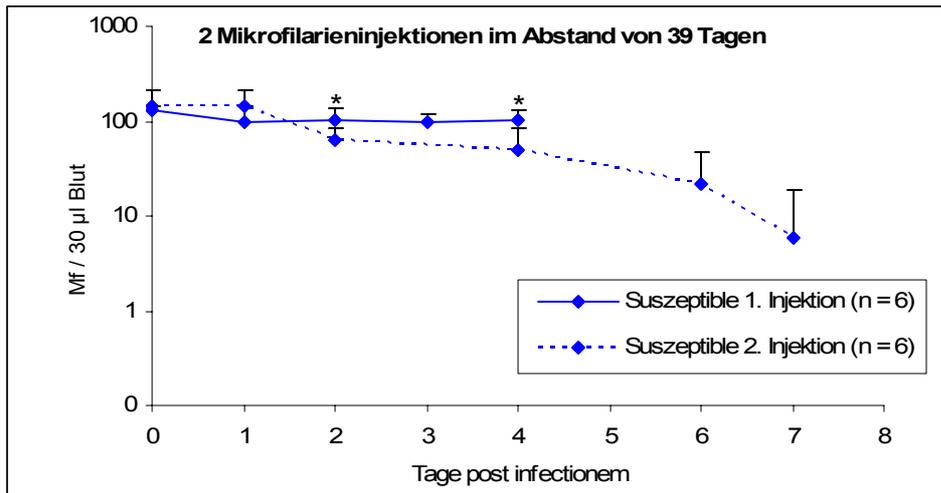


Abb. 3.23: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Mäusen der Rückkreuzungsgeneration N15 nach intravenöser Injektion von 50 000 sowie 39 Tage später erneut 50 000 Mikrofilarien. *: $p \leq 0.05$.

Die Mikrofilariendichten an Tag 2 und 4 nach der Zweitinfektion lagen signifikant unter den entsprechenden Werten der Erstinjektion. Nach Tag 4 war der Mikrofilarienabbau gegenüber einer Erstinjektion stark beschleunigt.

3.1.1.5 Einfluss von Plasma- und Blutübertragung auf die Mikrofilariämie suszeptibler Mäuse

Um festzustellen, ob die innate Resistenz durch Blutplasma bzw. Vollblut von resistenten Mäusen auf naive suszeptible Mäuse übertragbar ist, wurden Transferexperimente durchgeführt.

Im ersten Experiment wurden bei der Injektion von 50 000 Mikrofilarien zugleich 350 µl Plasma von naiven, homozygot resistenten N7F4-Mäusen auf suszeptible N7F4-Mäuse übertragen. Als Kontrollen wurden gleiche Volumina Plasma von naiven BALB/c-Mäusen gewonnen und ebenfalls simultan mit den Mikrofilarien in suszeptible Tiere injiziert. Hierbei ergab sich kein Unterschied in der Mikrofilariämie der beiden Versuchstiergruppen (Abbildung 3.24).

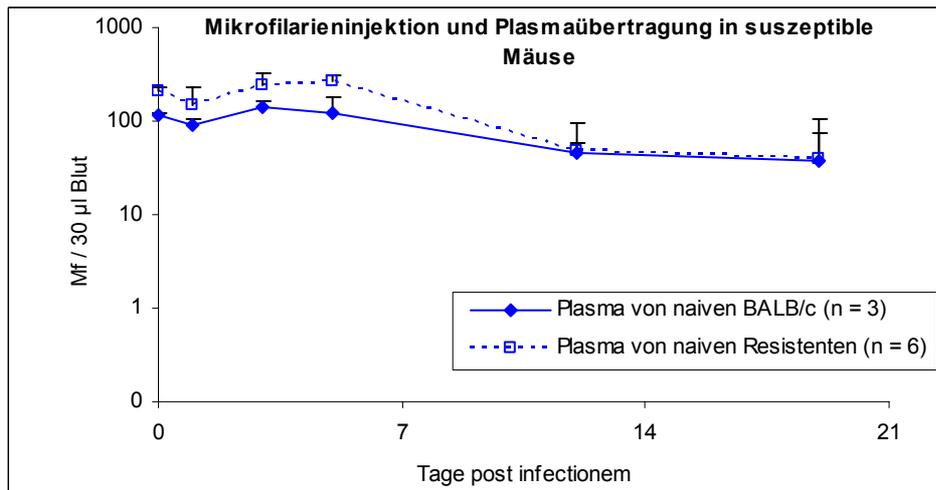


Abb. 3.24: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von suszeptiblen N7F4-Mäusen nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien bei gleichzeitiger Übertragung von 350 µl Plasma von naiven resistenten N7F4-Mäusen. Kontrolltiere erhielten 350 µl Plasma von naiven BALB/c-Mäusen.

In einem zweiten Experiment wurden zunächst 500 µl Vollblut von naiven, homozygot resistenten N14F2-Mäusen auf suszeptible N14F2-Mäuse übertragen und diesen drei Tage danach 50 000 Mikrofilarien injiziert. Als Kontrollen dienten suszeptible Mäuse, die ein entsprechendes Blutvolumen von naiven BALB/c-Mäusen und drei Tage später ebenfalls 50 000 Mikrofilarien injiziert bekamen (Abbildung 3.25).

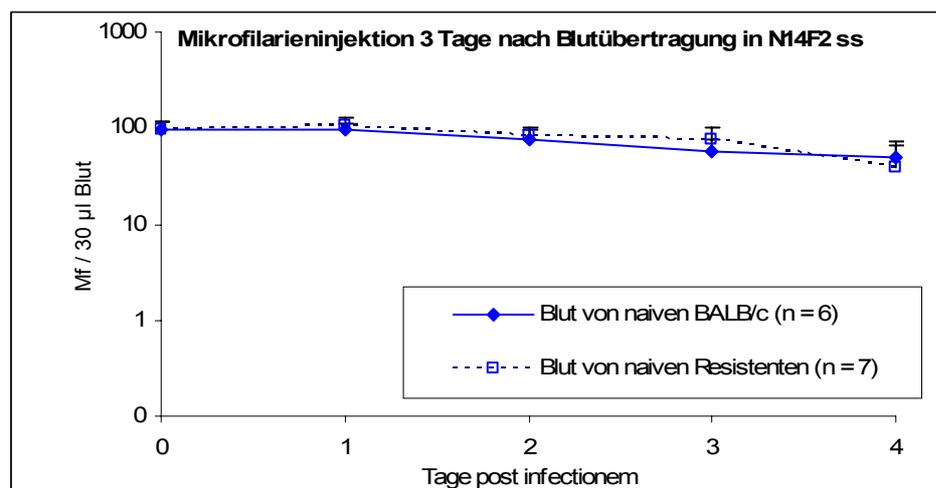


Abb. 3.25: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von suszeptiblen N14F2-Mäusen nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien drei Tage nach Übertragung von 500 µl Blut von naiven resistenten N14F2-Mäusen. Kontrolltiere erhielten 500 µl Blut von naiven BALB/c-Mäusen.

Die Mikrofilariämien der unterschiedlich behandelten Tiere unterschieden sich auch hier nicht. Im dritten Experiment wurden dann zunächst 500 µl Blut von naiven BALB/c-, naiven homozygot resistenten N7F9-Mäusen bzw. heterozygot resistenten N15-Mäusen, die acht Tage zuvor Mikrofilarien injiziert bekommen hatten, auf suszeptible N14F2-Mäuse übertragen und diesen einen Tag danach 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.26).

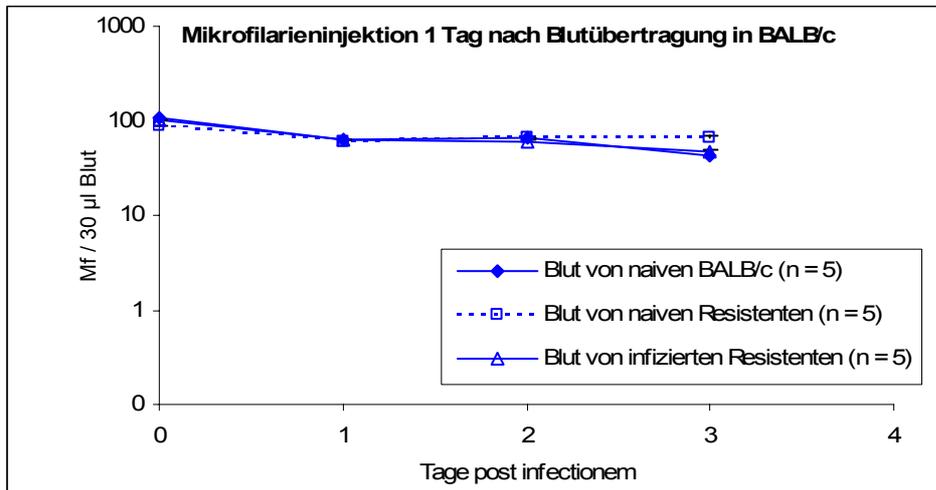


Abb. 3.26: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von suszeptiblen N14F2-Mäusen nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien drei Tage nach Übertragung von 500 µl Blut von naiven resistenten N7F9- bzw. vor acht Tagen mit Mikrofilarien infizierten resistenten N15-Mäusen. Kontrolltiere erhielten 500 µl Blut von naiven BALB/c-Mäusen.

Auch hier entsprachen sich die Mikrofilariämien der verschiedenen Versuchstiergruppen genau. Es konnte somit durch die Übertragung von Blut bzw. Plasma resistenter bzw. suszeptibler naiver bzw. infizierter Mäuse in genetisch suszeptiblen Mäusen kein Einfluss auf den Mikrofilarienabbau beobachtet werden.

3.1.1.6 Einfluss der Muttermilch resistenter Mäuse auf die Mikrofilariämie suszeptibler Mäuse

Es wurde weiterhin untersucht, ob sich Resistenz vermittelnde Faktoren in der Muttermilch resistenter Mäuse finden und auf Jungtiere übertragen lassen. Hierzu wurden BALB/c-Jungtiere im Alter von zwei Tagen sowie suszeptible N14F3-Jungtiere im Alter von fünf Tagen naiven, homozygot resistenten und zur selben Zeit säugenden Ammen untergelegt und

von diesen aufgezogen. Diesen Jungtieren wurden im Alter von 21 bzw. 18 Tagen je 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.27).

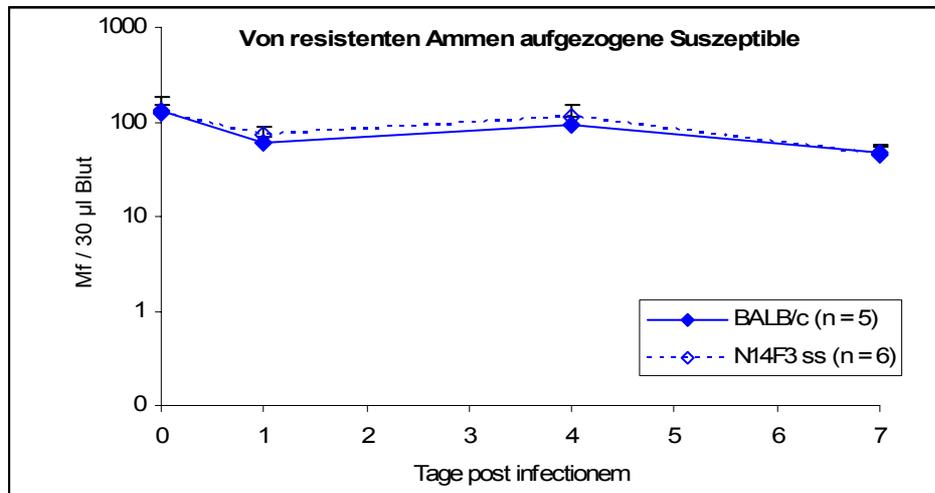


Abb. 3.27: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von suszeptiblen N14F3- und BALB/c-Mäusen, die im Alter von fünf bzw. zwei Tagen säugenden resistenten N14F2-Mäusen untergelegt wurden, nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien im Alter von 21 bzw. 18 Tagen.

Der Mikrofilarienabbau verlief wie bei normal aufgezogenen suszeptiblen bzw. BALB/c-Mäusen auch, es konnte kein Einfluss der Milch resistenter Mütter auf den Mikrofilariämieverlauf der Jungtiere beobachtet werden.

3.1.2 Natürliche Infektion mit L3

Neben den Infektionsexperimenten mit Mikrofilarien wurden auch solche mit dem infektiösen dritten Larvenstadium durchgeführt. Dazu wurden je elf resistenten N7F4- und BALB/c-Mäusen durch die Stiche je 50 infestierter Milben L3 übertragen. Lediglich bei einer BALB/c-Maus wurden dann 59 Tage nach der Infektion mit L3 Mikrofilarien im Blut nachgewiesen (1 Mf/µl), bei einer resistenten Maus wurden im Abdomenabklatsch 126 Mikrofilarien gefunden. Alle anderen Mäuse wurden nicht patent.

3.1.2.1 Adultwurmrückfindung und -länge

Je sechs Mäuse aus beiden mit L3 infizierten Gruppen wurden 61 Tage nach der Infektion obduziert und Anzahl (Abbildung 3.28) sowie Länge der gefundenen Adultwürmer bestimmt.

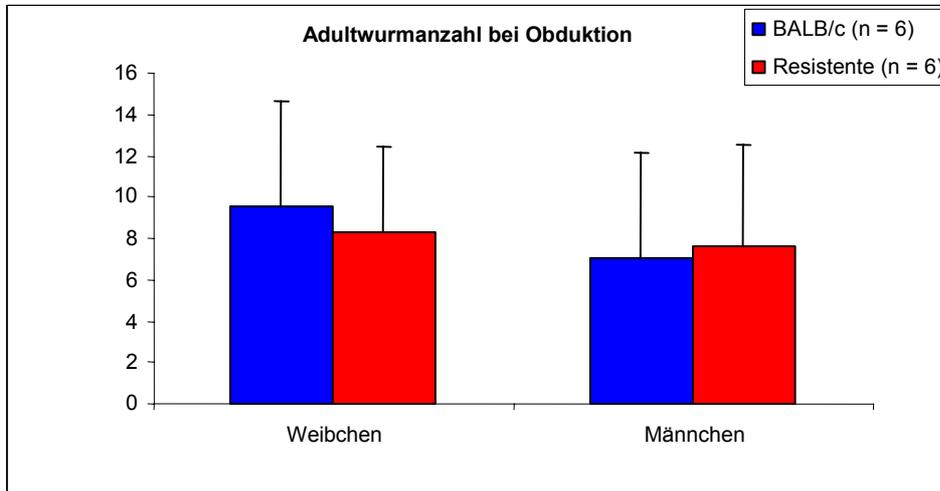


Abb. 3.28: Anzahl (a. M. + SD) wieder gefundener Adultwürmer bei Obduktion 61 Tage nach natürlicher Infektion mit L3.

Eine Rückfindungsquote kann nicht angegeben werden, da die Anzahl der natürlich übertragenen L3 nicht zu bestimmen war. Die absolute Anzahl wieder gefundener adulter Männchen und Weibchen lag im arithmetischen Mittel bei 8-9.5 bzw. 7-8 und unterschied sich zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen nicht. Die wieder gefundenen Adultwürmer wurden nach Geschlechtern getrennt vermessen, die mittleren Längen sind in Abbildung 3.29 wiedergegeben:

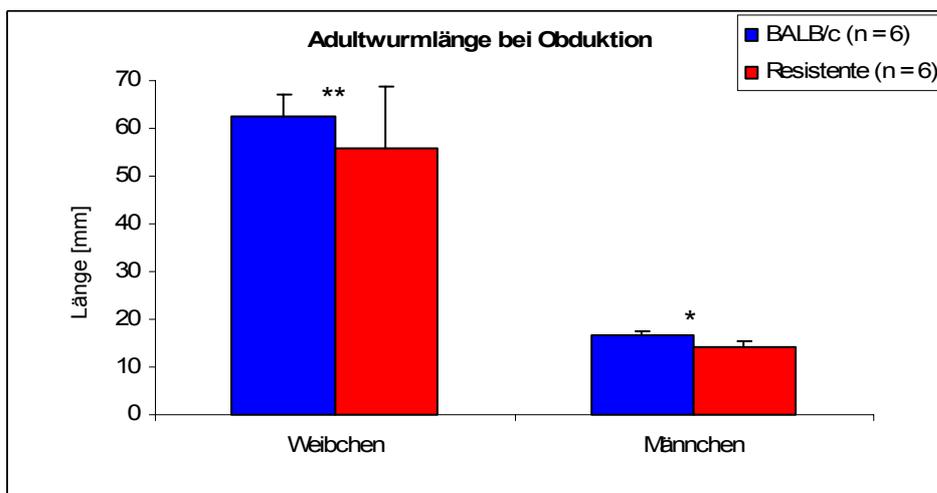


Abb. 3.29: Länge (a. M. + SD) wieder gefundener Adultwürmer bei Obduktion 61 Tage nach natürlicher Infektion mit L3. **: $p = 0.008$, *: $p = 0.01$; $n =$ Stichprobenumfang infizierter Mäuse.

Im Gegensatz zur Wurmrückfindung konnten hinsichtlich der Länge bei der Obduktion gefundener Adultwürmer zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Die Längen aus BALB/c-Mäusen gewonnener Adultwürmer lagen sowohl für Adultweibchen wie für Adultmännchen deutlich über denen aus resistenten Mäusen isolierter Adultwürmer (62 gegenüber 56 mm bzw. 17 gegenüber 14 mm, d. h. in resistenten Mäusen blieben weibliche Adultwürmer mehr als 10, männliche Adultwürmer mehr als 14 % kürzer als in BALB/c-Mäusen).

3.1.2.2 Mikrofilarieninjektion in nach L3-Infektion nicht patent gewordene resistente und BALB/c-Mäuse

Zur Überprüfung auf mögliche vakzinierende oder supprimierende Einflüsse, die während der Entwicklung der L3 zu Adultwürmern auftreten, auf nachfolgend injizierte Mikrofilarien bzw. die Immunantwort gegen diese wurden in je drei der nicht patent gewordenen resistenten und BALB/c-Mäuse 72 bzw. 80 Tage nach der natürlichen Infektion mit L3 je 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.30).

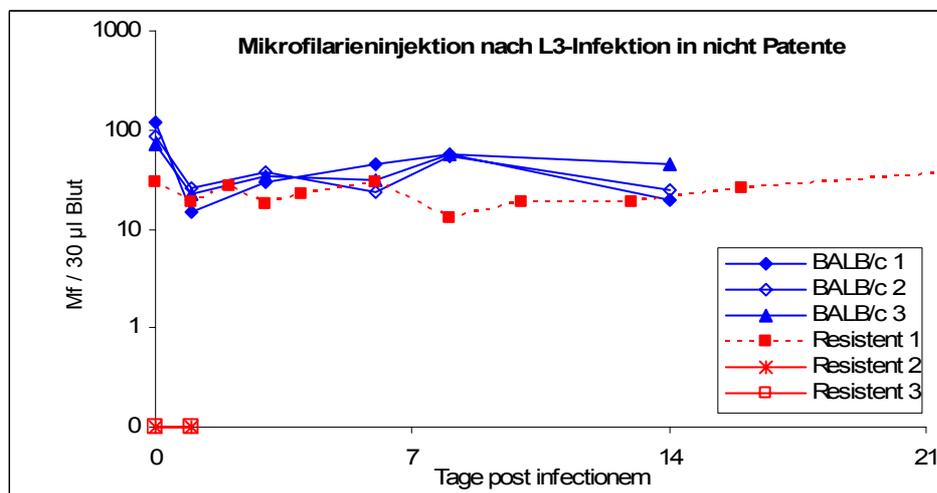


Abb. 3.30: Mikrofilariämie (a. M. + SD) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien in nicht patent gewordene resistente N7F4-Mäuse 72, in nicht patent gewordene BALB/c-Mäuse 80 Tage nach natürlicher Infektion mit L3.

Bei zwei resistenten Mäusen waren bereits eine Stunde nach der Injektion keine Mikrofilarien mehr im peripheren Blut nachweisbar, bei ihnen war der Mikrofilarienabbau gegenüber alleiniger Mikrofilarieninfektion beschleunigt. Eine resistente Maus hingegen zeigte einen

dem von BALB/c entsprechenden Mikrofilariämieverlauf. Bei ihr waren mehrere Wochen lang Mikrofilarien nachweisbar, so dass sie trotz gesicherten resistenten Genotyps als phänotypisch suszeptibel einzuordnen war. Die BALB/c-Mäuse zeigten eine lang andauernde Mikrofilariämie.

3.1.3 Implantation von L4 und Mikrofilarieninjektion

Um den Einfluss verschiedener Parasitenstadien auf die innate Resistenz gegen Mikrofilarien zu untersuchen, wurden aus natürlich infizierten Baumwollratten nach Obduktion L4 von *L. sigmodontis* gewonnen. In sechs resistente Mäuse wurden je 50 L4 implantiert. Als Kontrollen wurde bei weiteren sechs resistenten Mäusen RPMI als „Scheinimplantation“ intraperitoneal injiziert. Vier Tage nach diesem Eingriff wurden je 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.31).

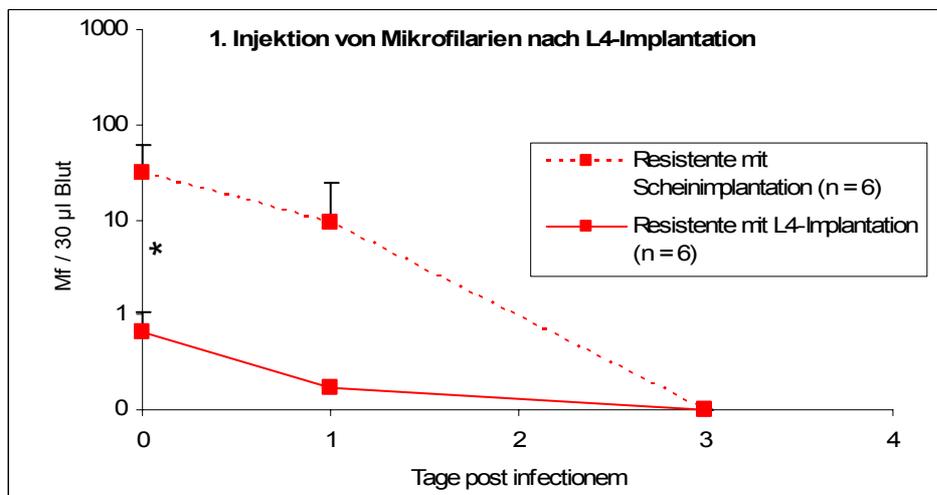


Abb. 3.31: Mikrofilariämie (a. M. + SD) resistenter N15-Mäuse nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien vier Tage nach Implantation von 50 L4 bzw. Scheinimplantation. *: p = 0.03.

Der Mikrofilarienabbau der Tiere mit vier Tage zuvor implantierten L4 war stark beschleunigt, bzw. waren zwei Stunden nach der Mikrofilarieninjektion nur bei einem der sechs Tiere Mikrofilarien im peripheren Blut nachweisbar. Der Mikrofilariämieverlauf der Mäuse mit Scheinimplantation entsprach dem normalerweise bei alleiniger Mikrofilarieninjektion zu beobachtenden.

Bei normaler Weiterentwicklung der implantierten L4 war davon auszugehen, dass sich aus ihnen nach einigen Tagen junge Adultwürmer entwickelt hatten. Um auch deren Einfluss auf eine nachfolgende Injektion von Mikrofilarien zu untersuchen, wurden 15 Tage nach der ersten Mikrofilarieninjektion in die Tiere mit implantierten L4 ein zweites Mal 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.32).

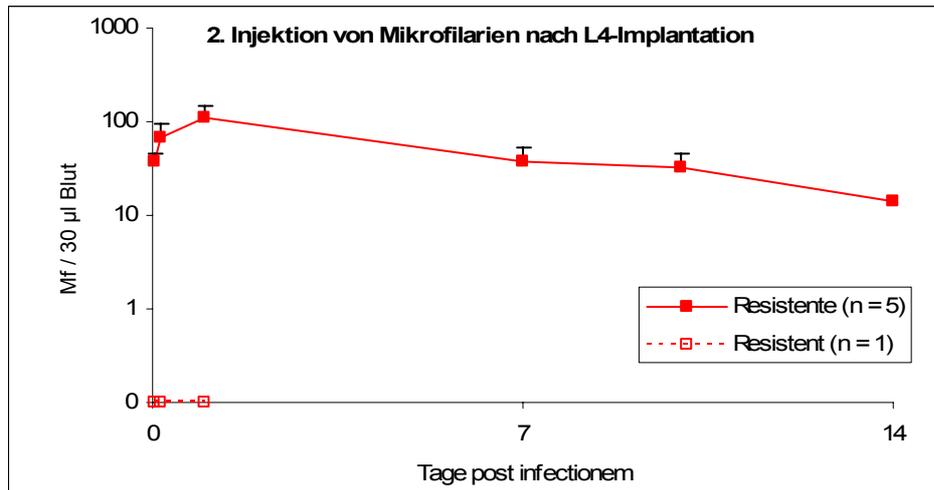


Abb. 3.32: Mikrofilariämie (a. M. + SD) resistenter N15-Mäuse nach 2. intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien 19 Tage nach Implantation von 50 L4 und 15 Tage nach 1. intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Bei einem Tier waren wiederum zwei Stunden nach der Mikrofilarieninjektion keine Mikrofilarien im peripheren Blut nachweisbar. In den fünf anderen Mäusen war der Mikrofilarienabbau hingegen nun stark verzögert, alle diese Mäuse waren länger als zwei Wochen nach der Zweitinjektion noch mikrofilarienpositiv.

In unabhängigen Kontrollexperimenten wurden suszeptiblen und resistenten Mäusen gleichalte L4 implantiert wie in den beschriebenen Experimenten, jedoch keine Mikrofilarien injiziert. Bei diesen Kontrolltieren waren ab Tag 6 nach der Zweitinjektion von Mikrofilarien in die Tiere aus Abbildung 3.32 im peripheren Blut Mikrofilarien nachweisbar (ohne Abbildung), die daher von den inzwischen adulten Filarien freigesetzt worden sein mussten. D. h. am Tag der Zweitinfektion mit Mikrofilarien bis sechs Tage *p. i.* waren in den Versuchstieren adulte, jedoch noch keine Mikrofilarien freisetzende Würmer vorhanden.

3.1.4 Implantation adulter Männchen und Mikrofilarieninjektion

In je fünf resistente Mäuse wurden je sechs adulte Männchen von *L. sigmodontis* implantiert bzw. RPMI als „Scheinimplantation“ intraperitoneal appliziert, drei Mäusen wurden je fünf durch Einfrieren abgetötete Männchen implantiert. Elf Tage nach diesen Eingriffen wurden je 50 000 Mikrofilarien injiziert (Abbildung 3.33).

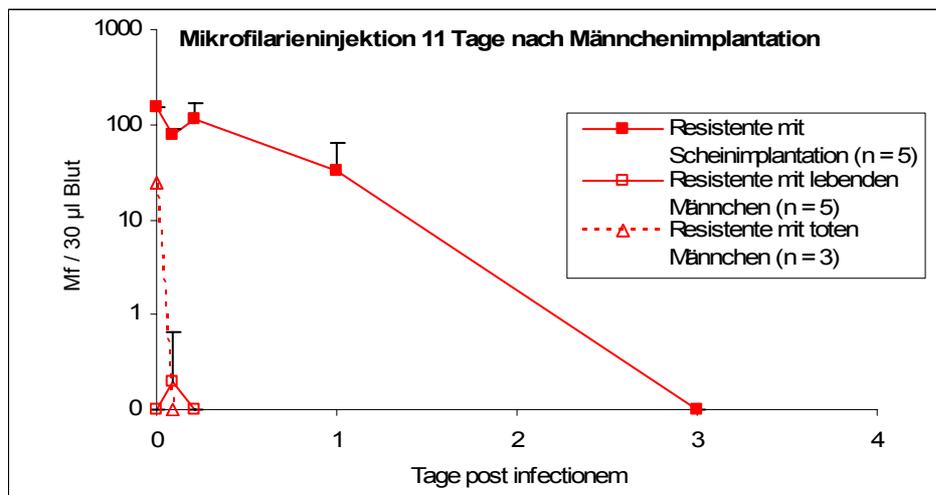


Abb. 3.33: Mikrofilariämie (a. M. + SD) resistenter N7F4-Mäuse nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien elf Tage nach Implantation sechs lebender Männchen bzw. fünf toter Männchen bzw. Scheinimplantation.

Die Tiere mit implantierten lebenden wie auch abgetöteten adulten Männchen zeigten einen stark beschleunigten Mikrofilarienabbau. Bei fast allen waren bereits zwei Stunden nach der Mikrofilarieninjektion keine Mikrofilarien mehr im peripheren Blut nachweisbar. Dagegen zeigten die Mäuse, die nur RPMI injiziert bekommen hatten, einen normalen Mikrofilariämieverlauf.

3.2 Zelluläre und humorale Parameter

3.2.1 Leukozyten- und Eosinophilendichte nach L3-Infektion

Je zehn resistente und BALB/c-Mäuse wurden mit L3 infiziert. 49 bzw. 57 Tage *p. i.* wurden die Dichten von Leukozyten und Eosinophilen im peripheren Blut bestimmt (Abbildung 3.34). Diese Zeitpunkte wurden gewählt, weil Haisch (1996) hier Unterschiede zwischen verschieden stark suszeptiblen Mäusestämmen nachweisen konnte.

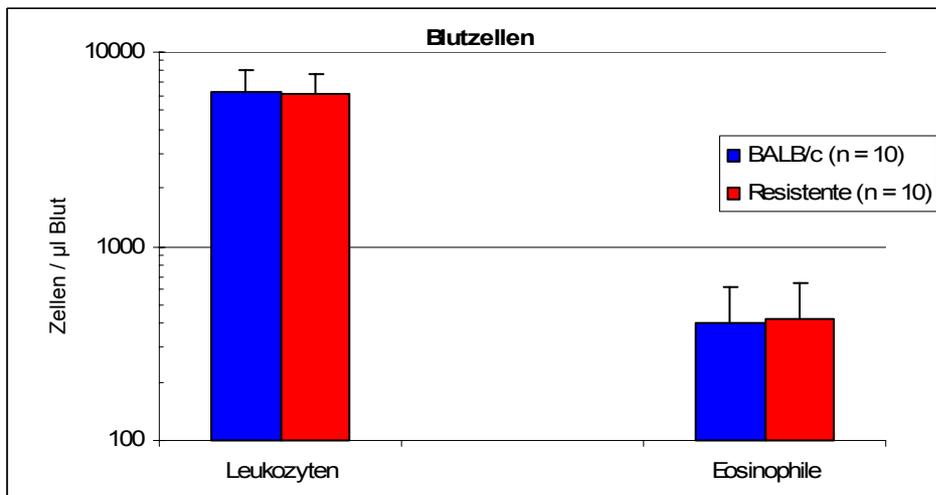


Abb. 3.34: Leukozyten- und Eosinophilendichte (a. M. + SD) 49 bzw. 57 Tage nach natürlicher Infektion mit L3 im Blut von BALB/c- und resistenten N7F4-Mäusen.

Beide Mäusestämme zeigten annähernd übereinstimmende Leukozyten- und Eosinophilen-dichten, signifikante Unterschiede konnten nicht gefunden werden.

3.2.2 FACS-Analysen bei naiven Mäusen, nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion

Es wurden FACS-Analysen zur Bestimmung der Anteile verschiedener Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes resistenter und suszeptibler Mäuse mit verschiedenem Infektionsstatus durchgeführt. Verglichen wurden 16 suszeptible (10 ♂, 6 ♀) und 27 resistente (14 ♂, 13 ♀) Mäuse ohne jegliche Vorbehandlung, je zehn suszeptible (3 ♂, 7 ♀) und resistente (4 ♂, 6 ♀) Mäuse fünf Stunden nach Injektion von 50 000 Mikrofilarien sowie

Ergebnisse

zehn suszeptible (6 ♂, 4 ♀) und neun resistente (5 ♂, 4 ♀) Mäuse 60 Tage nach natürlicher Infektion mit L3 (Abbildung 3.35).

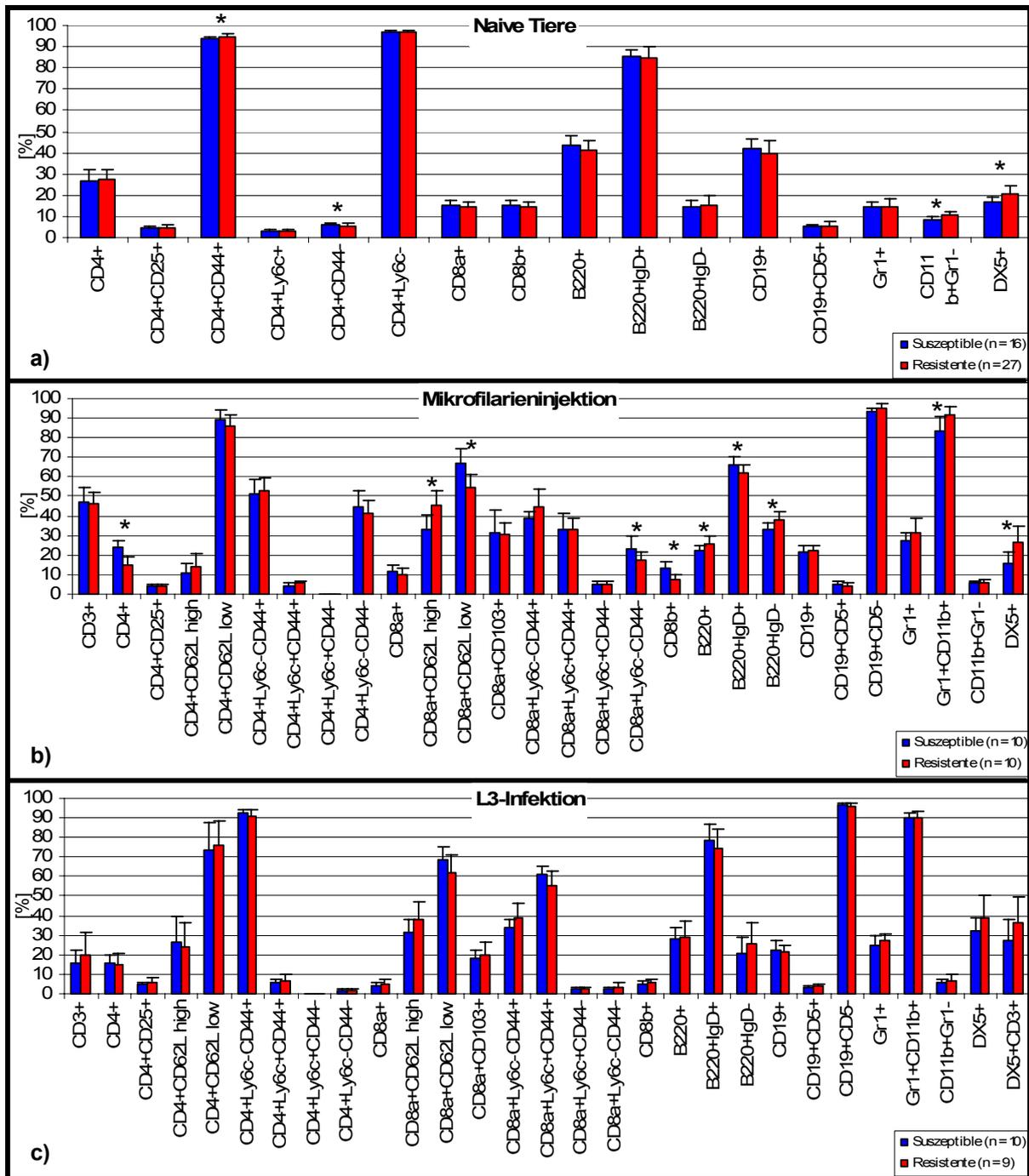


Abb. 3.35: FACS-Analysen des peripheren Blutes a) von naiven Mäusen, b) fünf Stunden nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien sowie c) 60 Tage nach natürlicher Infektion mit L3. Angegeben sind prozentuale Anteile der verschiedenen Zellpopulationen (a. M. + SD). *: $p < 0.05$.

Stammesspezifische Unterschiede hinsichtlich der Zellpopulationen:

Bei den naiven Tieren wiesen die resistenten Mäuse signifikant höhere Anteile von $T_{\text{Memory-}}$ ($CD4^+CD44^+$), NK-Zellen ($DX5^+$) und Monozyten ($CD11b^+Gr1^-$) gegenüber den suszeptiblen Mäusen auf, hinsichtlich naiver T_H -Zellen ($CD4^+CD44^-$) verhielten sich die Versuchsgruppen umgekehrt.

Nach Mikrofilarieninjektion lagen die Werte resistenter Mäuse für naive $T_{\text{Zytotoxisch-}}$ ($CD8a^+Ly6c^-CD44^-$) und B-Zellen ($B220^+IgD^-$), NK-Zellen sowie Granulozyten ($Gr1^+CD11b^+$) signifikant über, bei T_H -Zellen, Memory-/Effektor- oder aktivierten $T_{\text{Zytotoxisch-}}$ ($CD8a^+CD62L_{\text{low}}$), $CD8b^+T_{\text{Zytotoxisch-}}$ sowie maturen B-Zellen ($B220^+IgD^+$) signifikant unter denen suszeptibler Mäuse.

Nach L3-Infektion konnten zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Leukozytenpopulationen im peripheren Blut beobachtet werden.

Oberflächenrezeptorexpression:

Als Maß für die Aktivierung verschiedener Zellpopulationen können die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Einzelzellen angesehen werden, da eine stärkere Fluoreszenz mit mehr auf der Zelloberfläche exprimierten Molekülen des jeweils markierten Typs einhergeht. Nach Mikrofilarieninjektion war das geometrische Mittel der Fluoreszenz nur bei $CD8a^+T_{\text{Zytotoxisch-}}$ -Zellen bei suszeptiblen signifikant höher als bei resistenten Mäusen ($p = 0.0005$), bei allen anderen Zelltypen gab es keine signifikanten Unterschiede (ohne Abbildung).

Nach L3-Infektion waren bei suszeptiblen Mäusen die Fluoreszenzintensitäten von T_H -, B-Zellen und allgemein Leukozyten (B220) signifikant höher als bei resistenten Mäusen ($p \leq 0.05$).

Unterschiede nur hinsichtlich des Infektionsstatus:

Um unabhängig von den verwendeten Mäusestämmen die Veränderungen hinsichtlich der Zellpopulationen bei verschiedenen Infektionsstatus aufzuzeigen, sind in Abbildung 3.36 nur diejenigen Zellpopulationen dargestellt, für die signifikante Unterschiede zwischen Mäusen nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion jeweils gegenüber naiven Tieren bestehen. Hierbei wurden die jeweiligen Werte resistenter und suszeptibler Mäuse zu einem gemeinsamen Mittelwert zusammengefasst

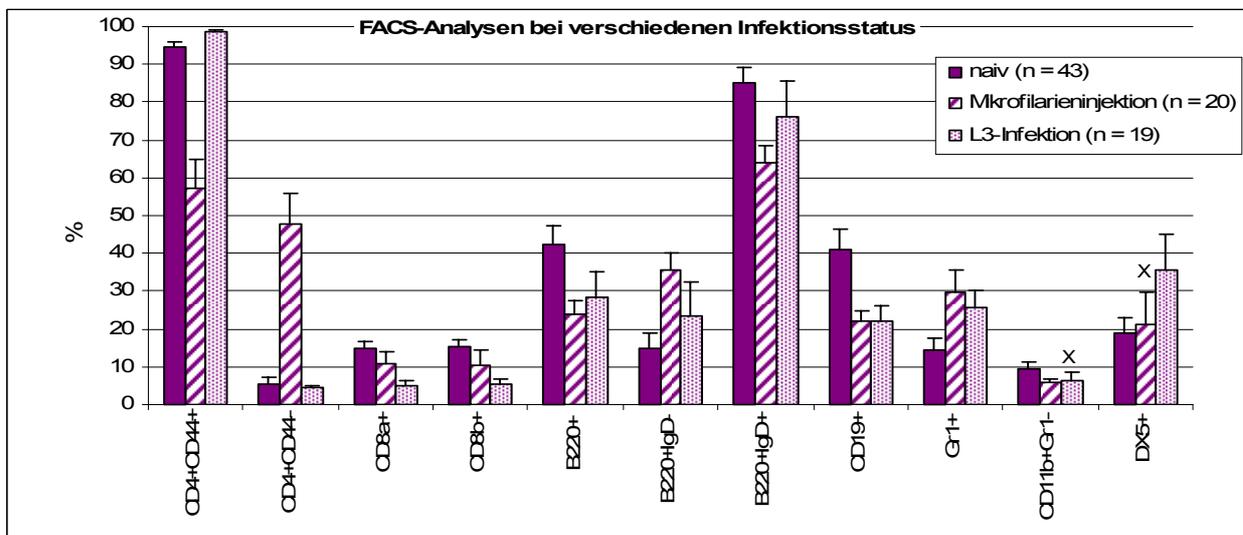


Abb. 3.36: FACS-Analysen des peripheren Blutes von Mäusen in naivem Zustand, fünf Stunden nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien sowie 60 Tage nach natürlicher Infektion mit L3. Angegeben sind prozentuale Anteile der verschiedenen Zellpopulationen (a. M. + SD). x: kein signifikanter Unterschied gegenüber naiven Tieren. Für alle anderen Zellpopulationen sind die Unterschiede von Mäusen nach Mikrofilarieninjektion bzw. L3-Infektion gegenüber naiven Tieren signifikant mit $p \leq 0.05$ bis $p \leq 2 \times 10^{-23}$.

Die Anteile aktivierter und T_H - und T_{Memory} -Zellen waren nach Mikrofilarieninjektion stark verringert gegenüber naiven Tieren, nach L3-Infektion hingegen leicht erhöht, bei naiven T_H -Zellen waren die Verhältnisse umgekehrt. $CD8a^+$ - und $CD8b^+T_{Zytotoxisch}$ -Zellen waren nach beiden Infektionsmodi gegenüber naiven Tieren verringert, ebenso Leukozyten ($B220^+$) sowie B-Zellen ($CD19^+$) allgemein. Immature B-Zellen waren nach beiden Infektionen in größeren Anteilen vorhanden, dementsprechend weniger mature B-Zellen. Die NK-Zell- und Granulozytenpopulationen hatten nach beiden Infektionen zugenommen, während eine Abnahme von Monozyten nach Infektion zu beobachten war.

3.2.3 Immunglobuline bei naiven Mäusen, nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion

In Blutproben derselben Tiere wie für die FACS-Analysen wurden mittels Bioplex-Assay die Konzentrationen verschiedener Immunglobuline unabhängig von ihrer Antigen-spezifität bestimmt (Abbildung 3.36). Zu beachten ist, dass die Ordinaten unterschiedlich skaliert sind, um die Unterschiede jeweils zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen desselben Infektionsstatus zu verdeutlichen.

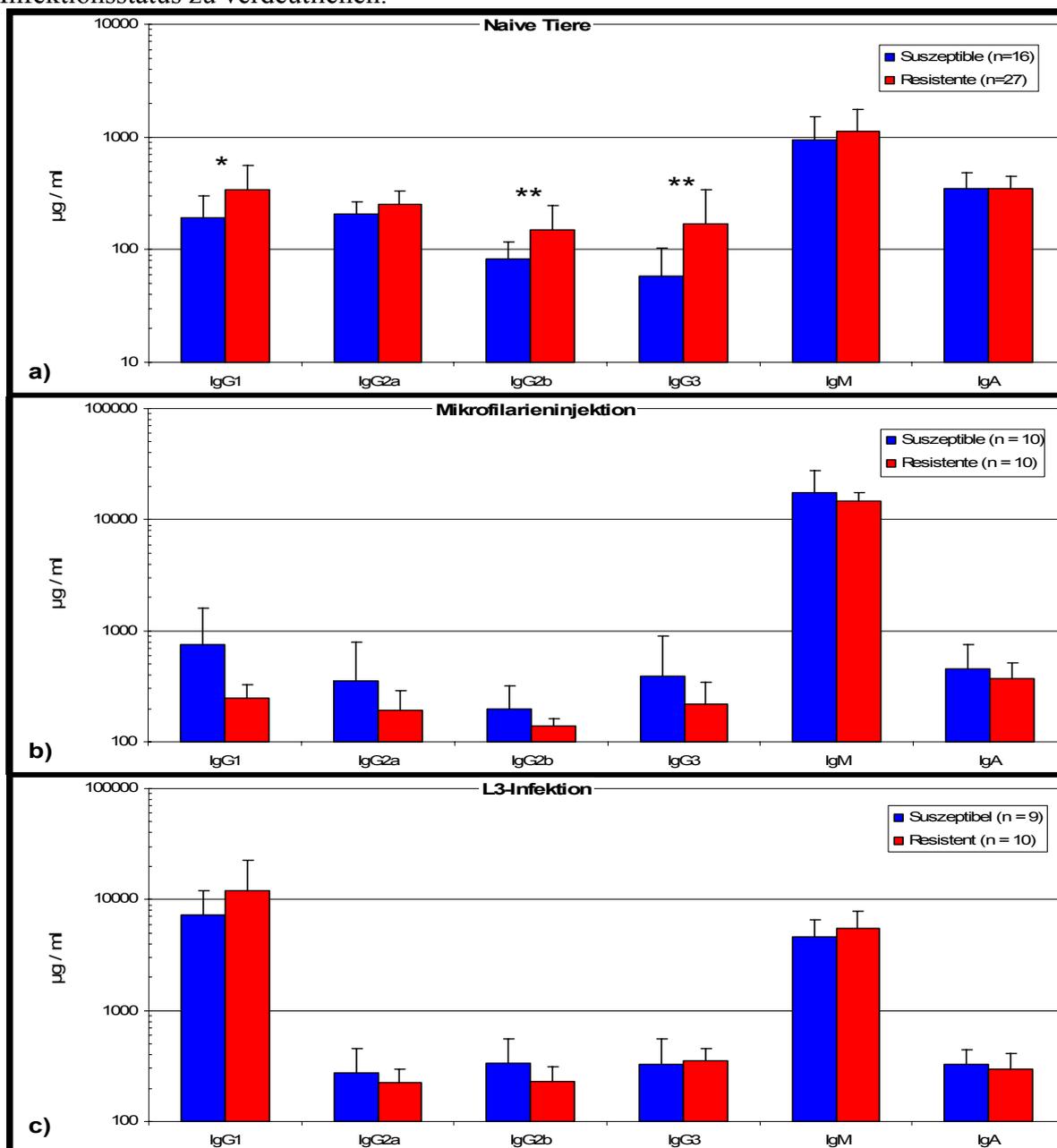


Abb. 3.37: Konzentrationen antigenunspezifischer Immunglobuline des peripheren Blutes a) von naiven Mäusen, b) fünf Stunden nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien sowie c) 60 Tage nach natürlicher Infektion mit L3 (a. M. + SD). *: $p < 0.01$; **: $p \leq 0.005$.

Bei naiven resistenten Tieren lagen die Konzentrationen von unspezifischem IgG1, IgG2b und IgG3 signifikant über denen naiver suszeptibler Tiere. Nach Mikrofilarieninjektion sowie natürlicher Infektion mit L3 waren keine Unterschiede nachweisbar.

Unterschiede nur hinsichtlich des Infektionsstatus:

Um stammesunabhängig die Veränderungen hinsichtlich der Immunglobulinkonzentrationen bei verschiedenen Infektionsstatus aufzuzeigen, sind in Abbildung 3.38 die Mittelwerte resistenter und suszeptibler Mäuse für diejenigen Immunglobuline zusammengefasst dargestellt, für die signifikante Unterschiede zwischen Mäusen nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion jeweils gegenüber naiven Tieren bestehen.

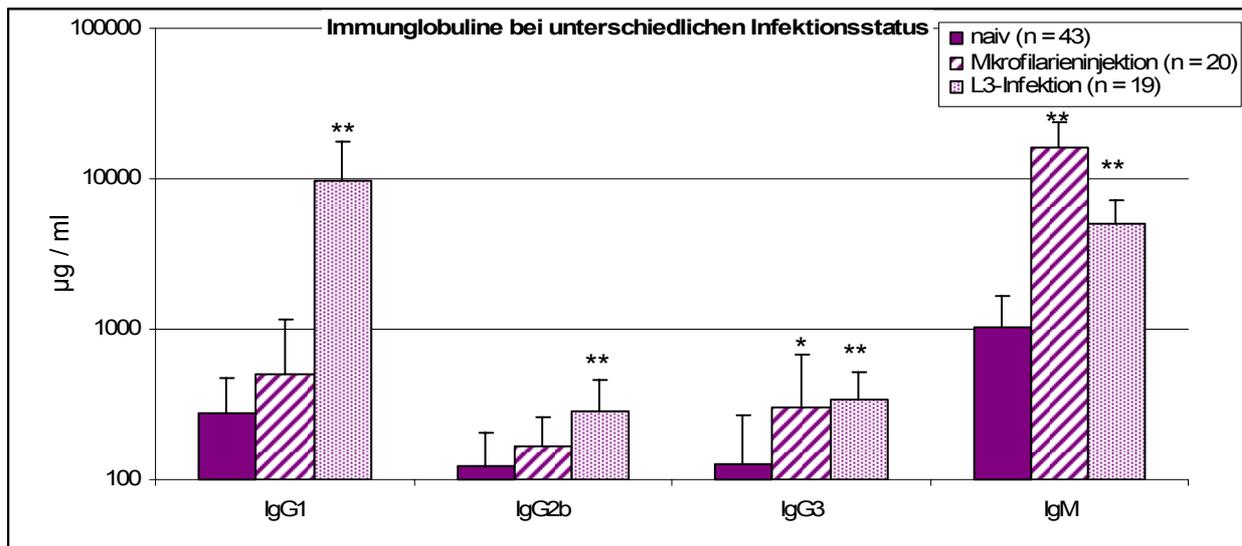


Abb. 3.38: Konzentrationen antigenunspezifischer Immunglobuline des peripheren Blutes von Mäusen in naivem Zustand, fünf Stunden nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien sowie 60 Tage nach natürlicher Infektion mit L3 (a. M. + SD). *: $p < 0.05$, **: $p \leq 0.001$.

Nach Mikrofilarieninjektion waren die Konzentrationen von IgG3 und IgM gegenüber naiven Tieren signifikant erhöht.

Sehr starke Zunahmen der Konzentrationen der Immunglobuline IgG1, IgG2b, IgG3 und IgM waren nach L3-Infektion gegenüber naiven Tieren zu beobachten.

3.2.4 Autoantikörper und Rheumafaktor nach Mikrofilarieninjektion und L3-Infektion

In Blutproben derselben mit Mikrofilarien bzw. L3 infizierten Tiere wie für die FACS- und Immunglobulin-Analysen wurden mittels ELISA in je zwei Messungen die Konzentrationen von Autoantikörpern und Rheumafaktor bestimmt. Nach Mikrofilarieninjektion waren weder Autoantikörper noch Rheumafaktor nachweisbar, die Ergebnisse für die L3-Infektion zeigt Tabelle 3.2. Bei naiven Tieren wurden keine Messungen durchgeführt.

Probe	anti-ds- und ss-DNA		Rheumafaktor	
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
Resistent 1	+	+	++	++
Resistent 2	nd	+	+	+
Resistent 3	nd	+	+	Nd
Resistent 4	+	+	+	Nd
Resistent 5	nd	+	nd	Nd
Resistent 6	nd	nd	++	+
Resistent 7	nd	+	++	Nd
Resistent 8	nd	+	+	+
Resistent 9	nd	nd	nd	Nd
Suszeptibel 1	nd	nd	nd	Nd
Suszeptibel 2	++	+	++	Nd
Suszeptibel 3	nd	+	+	Nd
Suszeptibel 4	nd	nd	nd	Nd
Suszeptibel 5	nd	nd	nd	Nd
Suszeptibel 6	nd	nd	+	Nd
Suszeptibel 7	nd	+	nd	Nd
Suszeptibel 8	nd	+	nd	Nd
Suszeptibel 9	nd	+	+	Nd
Suszeptibel 10	nd	+	nd	Nd

Tab. 3.2.: Relative Konzentrationen von Autoantikörpern und Rheumafaktor im Blut von Labormäusen 60 Tage nach Infektion mit L3. ++: hohe Antikörperkonzentrationen; +: Antikörper nachweisbar; nd = keine Antikörper nachweisbar. ds: double stranded (doppelsträngig), ss: single stranded (einsträngig).

Hinsichtlich Autoantikörper bestanden nach L3-Infektion keine Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen, jedoch war bei deutlich mehr resistenten als suszeptiblen Tieren Rheumafaktor im peripheren Blut nachweisbar.

3.3 Rolle der Lunge beim Mikrofilarienabbau

Um festzustellen, ob die beobachteten Unterschiede in der Eliminierung von Mikrofilarien auf anatomische oder physiologische Unterschiede – etwa im Kapillardurchmesser oder der Filterfunktion – zwischen Lungen resistenter und suszeptibler Mäuse zurückgehen, wurden 20 000 mit FITC markierte Microbeads mit einem Durchmesser von 10 μm in zehn BALB/c- sowie neun homozygot resistente Mäuse injiziert und eine halbe Stunde nach der Injektion Blutproben sowie bei der darauf folgenden Obduktion der Versuchstiere die kompletten Lungen entnommen. Die Lungen wurden als Quetschpräparate komplett unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und die Gesamtzahl aller in den Lungen befindlicher Microbeads bestimmt (Abbildung 3.39):

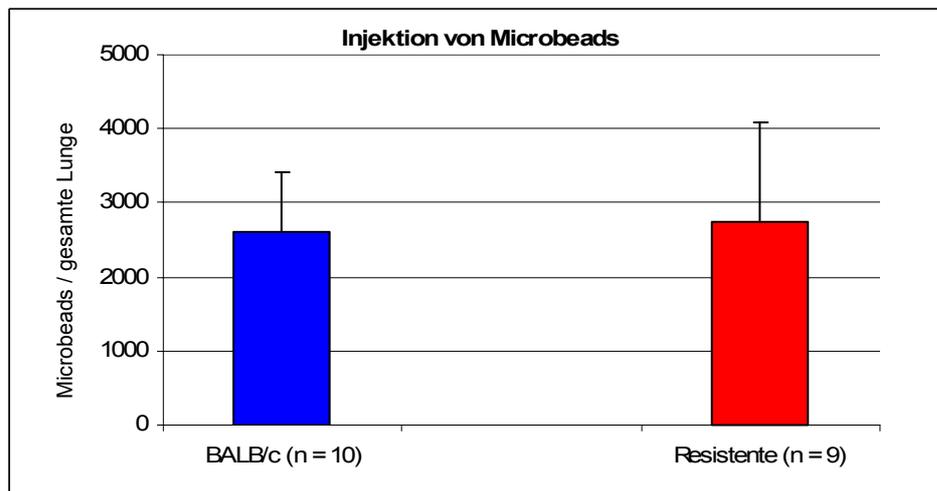


Abb. 3.39: Anzahl wieder gefundener 10 μm -FITC-Microbeads (a. M. + SD) in der gesamten Lunge von resistenten N7F9- bzw. N15- sowie BALB/c-Mäusen 30 Minuten nach Injektion von 20 000 Microbeads.

Die Gesamtzahl wieder gefundener Microbeads unterschied sich zwischen beiden Versuchstiergruppen nicht und lag bei ca. 13 % der insgesamt injizierten Microbeads. Im peripheren Blut waren bei keiner Probe Microbeads nachweisbar.

Ein weiteres Experiment mit unmarkierten 5 μm -Microbeads war nicht auswertbar, da die Microbeads mit dem Mikroskop in den Gewebeproben nicht zu finden waren.

3.4 Hauttransplantation zur Überprüfung der MHC-Übereinstimmung kongener Mäuse

Lange vor der Beschreibung seiner Rolle bei der Immunantwort war die Funktion des MHC für Erfolg und Misserfolg von Gewebetransplantationen bekannt. Bei Übertragung von Gewebe eines Spenders auf einen Empfänger mit unterschiedlichem MHC-Haplotyp erfolgen Abstoßungsreaktionen, die bereits unmittelbar nach der Transplantation einsetzen können, jedoch auch bis 90 Tage nach dem Eingriff auftreten können. Somit eignen sich umgekehrt Gewebstransplantationen, die länger als 90 Tage erfolgreich verlaufen, auch zum Nachweis der MHC-Übereinstimmung von Spender und Empfänger.

In diesem Experiment wurde je einer homozygot resistenten und suszeptiblen Maus ein Stück Nackenhaut entnommen und dem jeweils anderen Tier so transplantiert, dass die Haarwuchsrichtung des Transplantats der des Empfängers entgegengesetzt war. Den Zustand des Transplantats bei der resistenten Maus 95 Tage nach der Operation zeigt Abbildung 3.40:

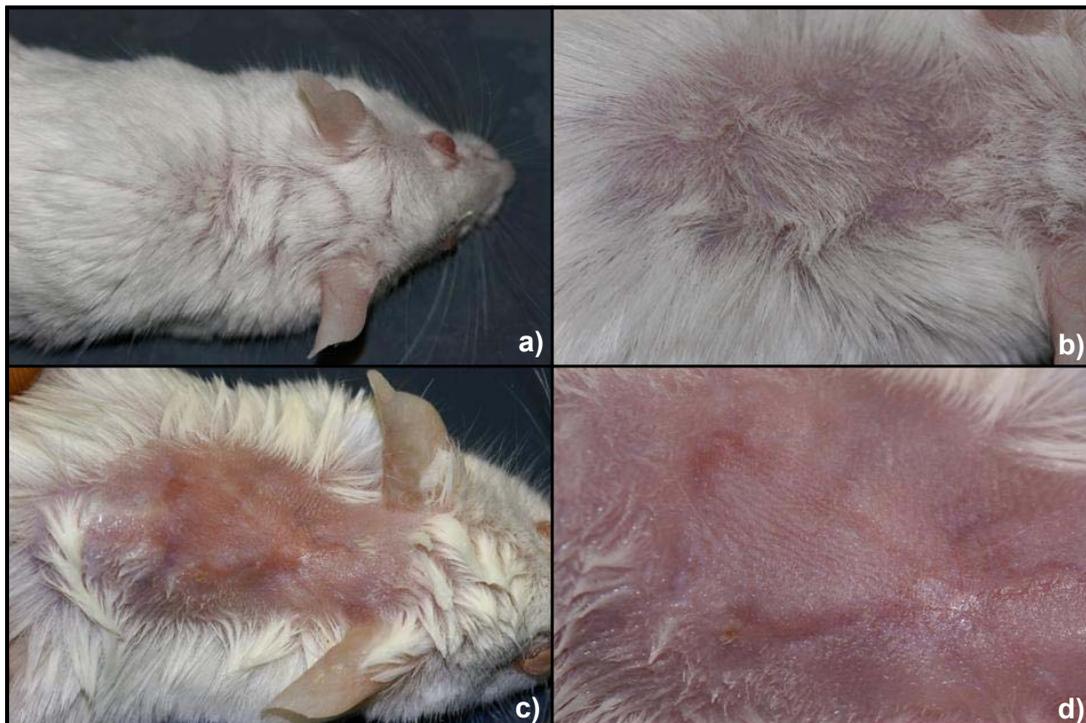


Abb. 3.40: Resistente N7F9-Maus 95 Tage nach Transplantation von Nackenhaut einer suszeptiblen N7F4-Maus. In b), c), d) wurde das Fell rasiert bzw. die Stelle komplett enthaart.

Bei beiden Tieren waren die Transplantate vollständig angewachsen und in das umgebende Gewebe integriert. Bis das Experiment nach 105 Tagen beendet wurde, waren keine Abstoßungsreaktionen eingetreten.

3.5 Genomanalysen

An DNAs der in Tabelle 2.1 aufgeführten Tiere wurde mit den in Tabelle 2.2 und 2.3 aufgelisteten Markern eine genomweite Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Interessant sind diejenigen Marker, für die die resistenten Tiere verschiedener Rückkreuzungsgenerationen heterozygot sind, d. h. auch DBA/1-Allele tragen. Abbildung 3.41 zeigt beispielhaft ein Gelbild für die Mikrosatelliten D3Mit110, D8Mit50 und D12Mit150 bei 39 resistenten N2-Tieren sowie je einem BALB/c-, DBA/1- und F1-Tier. Zu erkennen ist z. B., dass das Tier 1 für D3Mit110 heterozygot ist, also BALB/c- und DBA/1-Allele aufweist, während es für D8Mit50 nur BALB/c-Allele besitzt.

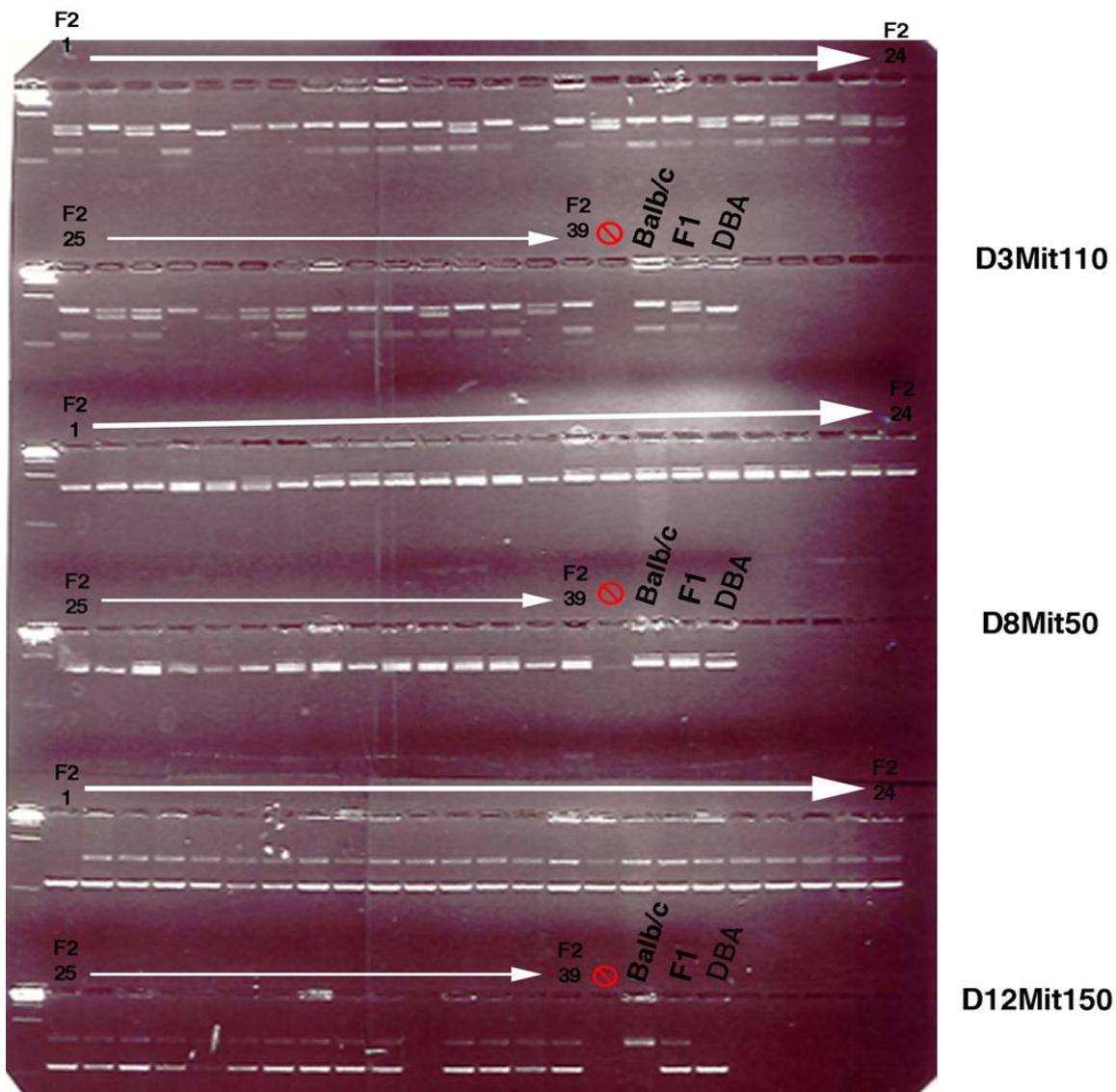


Abb. 3.41: Mikrosatellitenanalyse mit den Markern D3Mit110 (oberer Gelabschnitt), D8Mit50 (mittlerer Gelabschnitt) und D12Mit150 (unterer Gelabschnitt) an 39 N2-Tieren (hier: F2) und zum Vergleich jeweils 1 BALB/c-, 1 DBA/1- sowie 1 F1-Tier. : leer

Anhand der Verteilung der beobachteten Hetero- und Homozygotien bei den 39 resistenten N2-Tieren wurden Linkage-Analysen durchgeführt, um über Kopplung der verwendeten Marker an den hypothetischen Mikrofilariämieresistenzlocus auf dessen Lage schließen zu können (Tabelle 3.3).

Chromosom	Marker	Tierzahl	Distanz [cM]	SD	p
3	D3Mit67	38	15.79	5.92	< 0.001
9	D9Mit336	39	17.95	6.15	< 0.001
9	D9Mit355	39	15.38	5.78	< 0.001
9	D9Mit151	39	23.08	6.7	< 0.01
11	D11Mit2	39	30.77	7.39	< 0.05
12	D12Mit91	39	30.77	7.39	< 0.05
12	D12Mit158	35	25.71	7.39	< 0.01
12	D12Mit118	37	21.62	6.77	< 0.01
12	D12Mit133	39	2.56	2.53	< 0.001
12	D12Nds2	38	2.63	2.6	< 0.001

Tab. 3.3: Übersicht über die Genloci, für die eine Linkage-Analyse mit 39 resistenten N2-Tieren eine Kopplung mit dem Resistenzlocus ergab.

Für die Chromosomen 3, 9 und 12 wurden signifikante Zusammenhänge zwischen verschiedenen Markern und dem Mikrofilariämieresistenzlocus gefunden, wobei die Marker D12Mit133 und D12Nds2 die besten Ergebnisse bzw. die geringsten Distanzen zu diesem Locus erbrachten. Abbildung 3.42 zeigt für die Marker auf Chromosom 12 die bei den 39 Tieren aufgetretenen Haplotypen, und die Genloci in der sich daraus ergebenden wahrscheinlichsten Reihenfolge ($p = 1$).

D12Mit91	■	□	□	□	■	■	□	■	□	■	□
D12Mit158	■	■	□	□	□	□	?	?	□	?	?
D12Mit118	■	■	■	□	□	□	□	?	?	■	□
D12Mit133	■	■	■	■	■	■	□	■	■	■	■
mfr	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Tierzahl	23	3	1	5	1						

Abb. 3.42: Haplotypenschema von 5 Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 12 für 39 resistente N2-Tieren.

■ = heterozygot; □ = homozygot BALB/c; ? = unklar.

Ergebnisse

Die zweitwahrscheinlichste Anordnung

D12Mit158 → *mfr* → D12Mit118 → D12Mit133 → D12Mit91

hat nur eine Wahrscheinlichkeit von 0.2740 und ist schon aufgrund der bekannten tatsächlichen Lage der Mikrosatellitenmarker nicht möglich.

Eine weitere Auswertung unter Einbeziehung aller in Tabelle 2.1 aufgeführten 72 Tiere (Tabelle 3.4) bestätigte diese Ergebnisse.

Chromosom	Marker	Tierzahl	Distanz [cM]	SD	p
3	D3Mit67	70	25.71	5.22	< 0.001
9	D9Mit336	72	30.56	5.43	< 0.01
10	D10Mit230	72	36.11	5.66	< 0.05
12	D12Mit133	71	28.17	5.34	< 0.001
12	D12Nds2	71	28.17	5.34	< 0.001

Tab. 3.4: Übersicht über die Genloci, für die eine Linkage-Analyse mit insgesamt 72 Tieren, davon 39 resistenten N2-Tieren eine Kopplung mit dem Resistenzlocus ergab.

Zwischen D12Nds2 und D12Mit133 gab es keine Rekombinationen, beide Marker zeigten übereinstimmendes Segregationsverhalten. Die spätere Mikrosatellitenanalyse von 255 N2-Tieren, davon 127 suszeptiblen und 128 resistenten, mit anderen Markern für Chromosom 12 (Tabelle 2.5) ergab folgendes Bild (Abbildung 3.43):

D12Mit280	■	■	■	□	□	■	□	□	□	□	□	■	□	□	□	
D12Nds2	■	■	?	■	■	■	?	□	□	?	□	?	□	?	■	■
D12Mit150	■	■	■	?	■	■	□	□	□	□	?	?	□	□	□	■
<i>mfr</i>	■	■	■	■	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	□	□
D12Mit144	■	□	■	■	■	□	□	□	□	□	□	□	■	□	□	□
Tierzahl	97	22	2	1	2	1	1	2	113	5	1	1	4	1	1	1
	Resistente								Suszeptible							

Abb. 3.43: Haplotypenschema von 5 Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 12 für 127 suszeptible und 128 resistente N2-Tiere. ■ = heterozygot; □ = homozygot BALB/c; ? = unklar.

Demnach wurde hier als wahrscheinlichste Position des Mikrofilariämieresistenzlocus eine Lage zwischen den Markern D12Mit150 und D12Mit144 berechnet.

Mit einem kombinierten Set von sechs Markern für Chromosom 12 (Tabelle 2.7) wurden DNAs von 110 kongenen Mäusen nach 7, 14 und 15 Rückkreuzungsgenerationen untersucht, davon 90 resistente und 20 suszeptible (Tabelle 2.6). Es wurden die in Abbildung 3.44 dargestellten Haplotypen gefunden.

D12Mit118	□	□	□	□	□	□	□	
D12Mit280	■	□	■	■	■	□	■	
D12Mit133	■	□	■	□	■	□	■	
D12Nds2	■	■	□	■	□	□	□	
D12Mit150	■	■	□	■	■	□	□	
D12Mit144	□	□	□	□	□	□	□	
Tierzahl	54		31	2	2	1	17	3
	Resistente					Suszeptible		

Abb. 3.44: Haplotypenschema von 6 Mikrosatellitenmarkern auf Chromosom 12 für kongene Mäuse, davon 90 resistente und 20 suszeptible.

■ = heterozygot; □ = homozygot BALB/c.

Hier gab es keine Rekombinationen zwischen D12Nds2 und D12Mit150. Für die Marker D12Mit280 und D12Mit133 waren mehrere suszeptible Tiere heterozygot.

3.6 Kreuzung *mfr*-kongener Mäuse mit immundefizienten Inzuchtstämmen

3.6.1 Nude x BALB/c.DBA/1-*mfr*

Homozygote Nude-Mäuse sind T-Zell-defizient und vollkommen nackt. Die Mutation ist rezessiv. Durch Kreuzung von Tieren dieses Stammes auf susceptible BALB/c-Hintergrund mit Mikrofilariämie-resistenten Tieren kann der Einfluss der T-Zellen auf die Vermittlung der Resistenz untersucht werden. Hierzu wurden Nude-Mäuse mit BALB/c.DBA/1-*mfr* gekreuzt. Die F1-Nachkommen, die sowohl für die Nude-Mutation als auch den *mfr* heterozygot sein mussten, waren normal behaart. Sie wurden mit Nude-Mäusen rückgekreuzt, um Tiere zu erhalten, die homozygot für die Nude-Mutation und heterozygot für das Resistenzgen waren. Von diesen acht N2-Tieren waren fünf unbehaart, drei wiesen normale Behaarung auf (Abbildung 3.45).



Abb. 3.45: Ca. 2 Wochen alte N2-Nachkommen der Kreuzung Nude x F1 (Nude x BALB/c.DBA/1-*mfr*) von gemeinsamen Elterntieren.

Nude-Mäuse, F1- und N2-Nachkommen wurden mit Mikrofilarien infiziert (Abbildung 3.46):

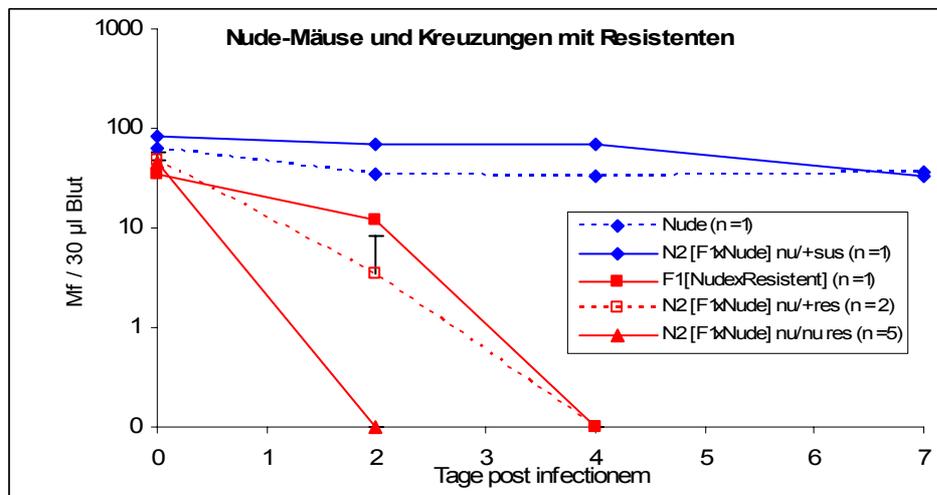


Abb. 3.46: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Nude-Mäusen, Tieren der F1 (Nude x BALB/c.DBA/1-*mfr*) sowie der N2 (F1 x Nude) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Nude-Mäuse erwiesen sich als suszeptibel, die F1-Nachkommen waren resistent. Sämtliche der unbehaarten, also für die Nude-Mutation homozygoten N2-Nachkommen zeigten einen resistenten Phänotyp mit sehr rascher Mikrofilarieneliminierung bis Tag 2 nach der Injektion. Von den drei normal behaarten N2-Nachkommen war dagegen eines suszeptibel.

3.6.2 SCID x BALB/c.DBA/1-*mfr*

Mäuse, die homozygot die rezessive *scid*-Mutation aufweisen, sind weitestgehend T- und B-Zell-defizient, die wenigen vorhandenen Zellen dieser Typen sind praktisch unfunktionell. Durch Kreuzung von Tieren dieses Stammes auf suszeptiblem BALB/c-Hintergrund mit Mikrofilariämie-resistenten Tieren kann der Einfluss von T- und B-Zellen auf die Vermittlung der Resistenz untersucht werden. Hierzu wurden SCID-Mäuse mit BALB/c.DBA/1-*mfr* gekreuzt. Die für die *scid*-Mutation wie auch für den *mfr* heterozygoten F1-Nachkommen wurden mit SCID-Mäusen rückgekreuzt, um Tiere zu erhalten, die homozygot für die *scid*-Mutation und heterozygot für das Resistenzgen waren. SCID-Mäuse, F1- und N2-Nachkommen wurden mit Mikrofilarien infiziert (Abbildung 3.47).

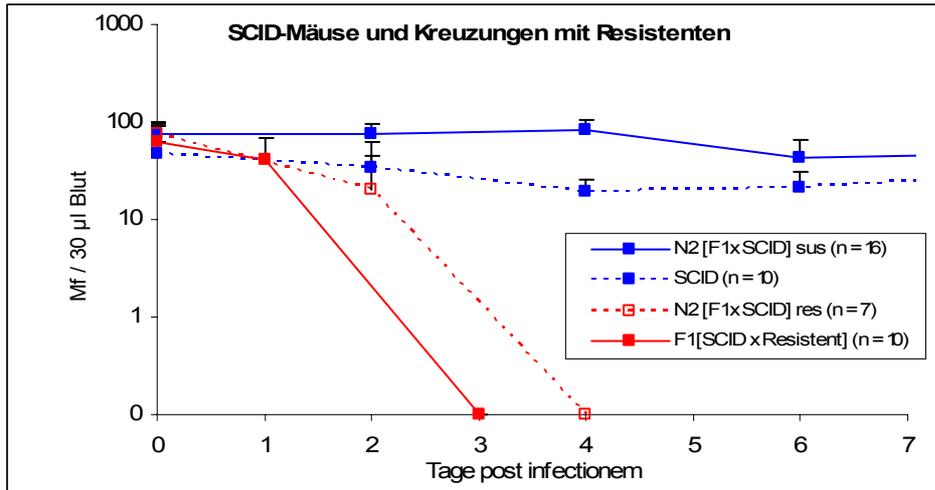


Abb. 3.47: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von SCID-Mäusen, Tieren der F1 (SCID x BALB/c.DBA/1-*mfr*) sowie der N2 (F1 x SCID) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

SCID-Mäuse waren suszeptibel, die F1-Nachkommen uniform resistent. Von den 23 N2-Nachkommen waren 16 suszeptibel und sieben resistent. Mit sieben der suszeptiblen Tiere wurde eine Genotypisierungs-PCR mit dem Mikrosatellitenmarker D12Nds2 durchgeführt (Abbildung 3.48).

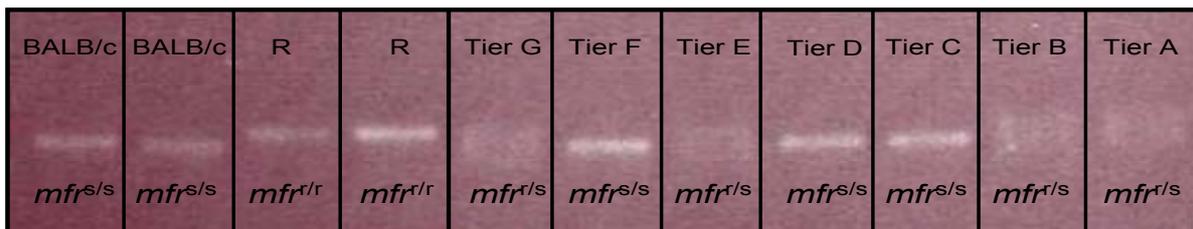


Abb. 3.48: Genotypisierung suszeptibler N2-Nachkommen (Tiere A bis G) aus der Kreuzung von SCID mit BALB/c sowie zum Vergleich von BALB/c- und homozygot resistenten Mäusen (R) mit dem Marker D12Nds2.

Unter den sieben getesteten, phänotypisch suszeptiblen N2-Tieren waren die Tiere A, B, E und G heterozygot für den Marker D12Nds2, wiesen also einen resistenten Genotyp auf.

3.6.3 $Ig\alpha^{-/-}$ x BALB/c.DBA/1-*mfr*

$Ig\alpha^{-/-}$ -Mäuse weisen keine funktionellen B-Zellen und damit auch keine Immunglobulinproduktion auf. Die Knockout-Mutation ist rezessiv. Durch Kreuzung von Tieren dieses Stammes auf susceptible BALB/c-Hintergrund mit Mikrofilariämie-resistenten Tieren kann der Einfluss der B-Zellen an der Vermittlung der Resistenz untersucht werden. Hierzu wurden $Ig\alpha^{-/-}$ -Mäuse mit BALB/c.DBA/1-*mfr* gekreuzt. Die sowohl für den Genknockout wie auch für den *mfr* heterozygoten F1-Nachkommen wurden mit $Ig\alpha^{-/-}$ -Mäusen rückgekreuzt, um Tiere zu erhalten, die homozygot für den $Ig\alpha$ -Knockout und heterozygot für den *mfr* waren. $Ig\alpha^{-/-}$, F1- und N2-Mäuse wurden mit Mikrofilarien infiziert (Abbildung 3.49).

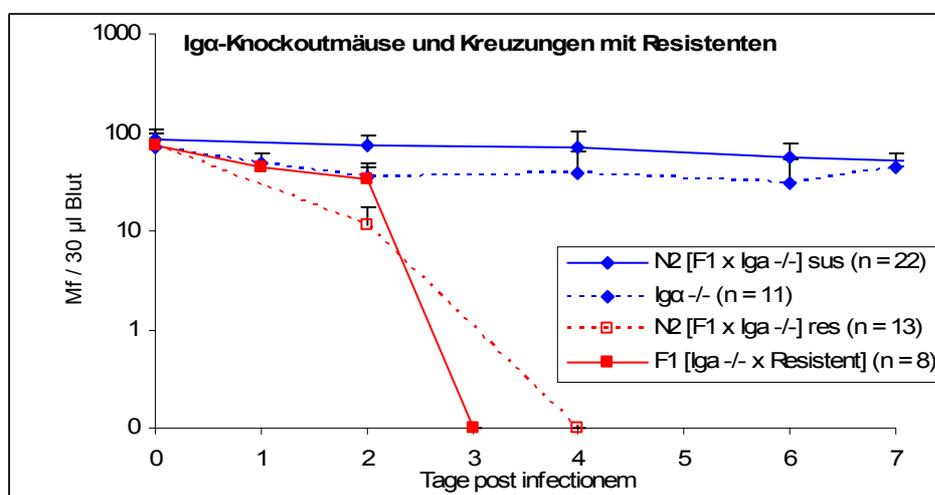


Abb. 3.49: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von $Ig\alpha^{-/-}$ -Mäusen, der F1 ($Ig\alpha^{-/-}$ x Resistent) sowie Tieren der N2 (F1 x $Ig\alpha^{-/-}$) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

$Ig\alpha^{-/-}$ -Mäuse waren susceptible mit gegenüber BALB/c-Mäusen deutlich verlängerter Mikrofilariämie. Die F1-Nachkommen waren uniform resistent, die N2-Nachkommen spalteten in 22 susceptible und 13 resistente Tiere auf. Mit nachfolgenden weiteren Versuchen (nicht gezeigt) ergaben sich insgesamt 39 susceptible und 14 resistente N2-Tiere.

Bei der Rückkreuzung der F1-Tiere mit $Ig\alpha^{-/-}$ -Mäusen ist zu erwarten, dass in der N2 50 % aller Tiere heterozygot für den *mfr* sind und von diesen wiederum je 50 % heterozygot bzw. homozygot den $Ig\alpha$ -Knockout tragen. Unter der Annahme, dass der Genknockout die Resistenz beeinflusst, also B-Zellen an der Vermittlung der Resistenz beteiligt sind, wären in der N2 demnach 25 % phänotypisch resistente und 75 % susceptible Tiere zu erwarten. Der

Binomialtest ergibt für die insgesamt 53 N2-Nachkommen unter der Annahme einer solchen 1:3-Aufspaltung einen möglichen Bereich von 7 bis 19 resistenten Mäuse.

Geht man davon aus, dass ein $Ig\alpha$ -Knockout bei genotypisch resistenten Tieren keine Änderung des Phänotyps hervorruft, so wäre in der N2 eine Aufspaltung in resistente und suszeptible Tiere im Verhältnis 1:1 zu erwarten. Hierfür gibt der Binomialtest einen Referenzbereich von 19 bis 33 resistenten Mäusen an, die beobachteten 14 resistenten N2-Tiere entsprechen damit nicht dem Erwartungswert für diese Aufspaltung.

3.7 Mikrofilarieninjektionen bei verschiedenen Knockout-Mäusestämmen auf resistantem genetischem C57BL/6-Hintergrund

An Mäusen mehrerer Inzuchtstämme mit Knockouts verschiedener immunologisch relevanter Gene (IL-10, MARCO, TNF-Rezeptor p55, INF- γ -Rezeptor 1) auf resistantem C57BL/6-Hintergrund wurden Mikrofilarieninjektionen durchgeführt (Abbildung 3.50).

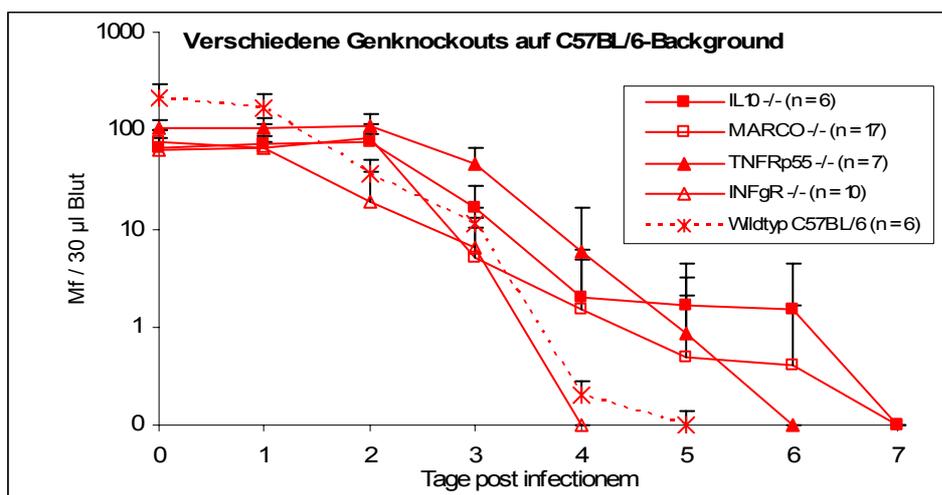


Abb. 3.50: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von IL-10^{-/-}, MARCO^{-/-}, TNFRp55^{-/-} und INF γ ^{-/-}-Mäusen nach intravenöser Injektion von 50 000 bzw. von C57BL/6 nach Injektion von 100 000 Mikrofilarien. Der Mikrofilariämieverlauf von C57BL/6 ist aus Pfaff (2001) entnommen.

Bei keinem dieser Knockoutstämme waren wesentliche Unterschiede in der Mikrofilariämie gegenüber dem Wildtypstamm C57BL/6 zu beobachten. Sämtliche $\text{INF-}\gamma\text{R}^{-/-}$ -Mäuse waren vier Tage nach der Injektion mikrofilarienneutral. Die etwas verlängerten Mikrofilariämien der drei anderen Knockoutstämme gehen auf jeweils nur ein ($\text{MARCO}^{-/-}$, $\text{TNFRp55}^{-/-}$) oder zwei Tiere ($\text{IL-10}^{-/-}$) zurück, der weit überwiegende Teil der jeweiligen Tiere wies bereits an Tag 3 oder 4 nach der Injektion keine zirkulierenden Mikrofilarien mehr im peripheren Blut auf.

3.8 Einkreuzung des Suszeptibilitätsallels auf resistenten genetischen DBA/2-Hintergrund

Resistente DBA/2-Mäuse mit weitestgehend übereinstimmendem Genom zu resistenten DBA/1-Mäusen, jedoch dem MHC-Haplotyp suszeptibler BALB/c-Mäuse, wurden mit letzteren gekreuzt. Die F1-Nachkommen wurden mit DBA/2-Mäusen rückgekreuzt. Die daraus hervorgehenden N2-Nachkommen wurden untereinander verpaart, um Tiere zu erhalten, die homozygot suszeptibel bei überwiegendem Anteil DBA-Genom waren. Theoretisch wären in der N2 je 50 % hetero- und homozygot resistente Tiere zu erwarten und bei rein statistischer Verpaarung aller N2-Tiere untereinander in der N2F1 zu 6.25 % Tiere, die homozygot das Suszeptibilitätsallel von BALB/c für den *mfr* aufweisen, also suszeptibel sind. Insgesamt 34 N2F1-Tiere wurden mit Mikrofilarien infiziert (Abbildung 3.51).

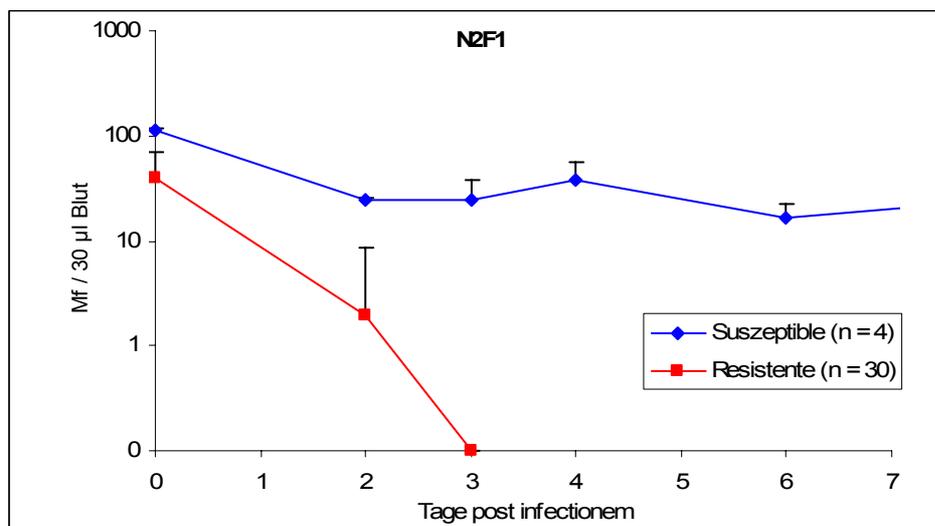


Abb. 3.51: Mikrofilariämie (a. M. + SD) von Tieren der Generation N2F1 (N2 x N2) nach intravenöser Injektion von 50 000 Mikrofilarien.

Ergebnisse

Die N2F1-Tiere spalteten in 30 resistente und 4 suszeptible Tiere auf, was Anteilen von 88.2 und 11.8 % entspricht. Mit diesen Mäusen wurde eine Genotypisierungs-PCR mit dem Mikrosatellitenmarker D12Nds2 durchgeführt (Abbildung 3.52)

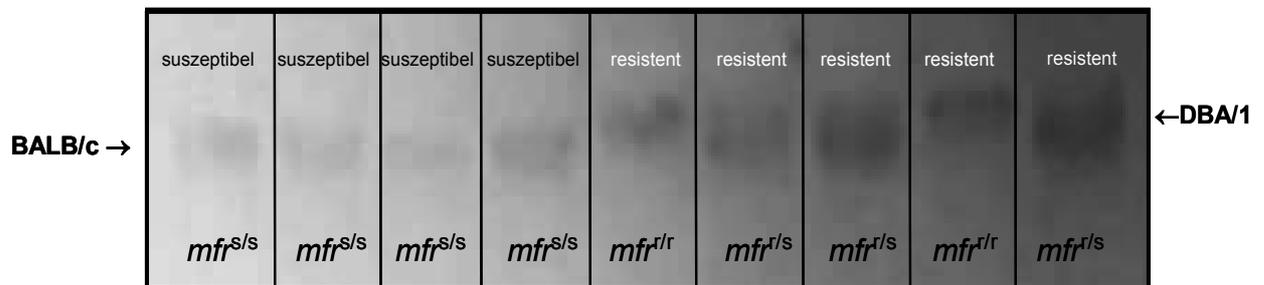


Abb. 3.52: Genotypisierung resistenter und suszeptibler N2F1-Nachkommen aus der Kreuzung von DBA/2 und BALB/c mit dem Marker D12Nds2.

Unter den resistenten Tieren waren solche, die für *mfr* homozygot DBA-Allele aufwiesen, ebenso wie solche, die heterozygot für BALB/c- und DBA-Allele waren. Die suszeptiblen Tiere zeigten denen von BALB/c entsprechende Allele. Somit ergab diese Kreuzung auf rechnerisch überwiegend resistentem genetischem Hintergrund genotypisch wie auch phänotypisch suszeptible Mäuse.

3.9 Genexpressionsanalysen

An resistenten und BALB/c-Mäusen wurden in einem ersten Experiment (3.1.6.1) in unbehandeltem Zustand, nach Injektion von RPMI (Scheinbehandlung) sowie nach Mikrofilarieninjektion Genexpressionsanalysen durchgeführt. Hier wird die Genexpression resistenter Mäuse sowie die differenzielle Genexpression zwischen resistenten und suszeptiblen Tieren bei den unterschiedlichen Behandlungen dargestellt, die Beschreibung der Genexpression bei suszeptiblen Mäusen als Folge der unterschiedlichen Behandlungen findet sich bei Schmidt-Oehm (2006).

In einem zweiten Experiment (3.1.6.2) wurden Genexpressionsanalysen an resistenten und suszeptiblen Tieren nach Mikrofilarieninjektion, nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion sowie nach Implantation adulter Weibchen und Mikrofilarieninjektion durchgeführt. Für Adultweibchen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, in resistenten Mäusen eine Suszeptibilität gegenüber nachfolgend injizierten Mikrofilarien zu induzieren, während bei BALB/c keine Änderung des Abbauverhaltens zu beobachten ist (Schumacher 2002). Auch hier findet sich die Beschreibung der grundlegenden Vorgänge bei BALB/c bei Schmidt-Oehm (2006).

3.9.1 Erste Genexpressionsanalyse

3.9.1.1 Genexpression bei resistenten Mäusen nach Scheinbehandlung im Vergleich zu naiven Tieren

Nach Injektion von RPMI waren gegenüber unbehandelten Tieren 229 Gene differenziell exprimiert, darunter 79 herunter- und 150 heraufregulierte.

Die durch den Eingriff heraufregulierten Gene umfassten unter anderem Gene, die funktionell mit Proteinmetabolismus und -transport (19 Gene), Zellzyklus und Wachstum (13 Gene), Transkription (7 Gene), Immunabwehr und Inflammation (13 Gene) oder Chemotaxis und Zell-Zell-Kommunikation (12 Gene) assoziiert sind. Im Einzelnen waren darunter unter anderem IL-1 β , IL-1r2, Fos, JunB, Cdkn1a (p21) und Cdkn1b (p27). Unter den heraufregulierten Genen waren auch drei auf Chromosom 12 in der Resistenzgenkandidatenregion lokalisierte: Igh-6 (immunoglobulin heavy chain 6, schwere Kette von IgM)

Ergebnisse

bei 58.0 cM, Igh-4 (immunoglobulin heavy chain 4, schwere Kette von Serum-IgG1) ebenfalls bei 58.0 cM sowie Jag2 (jagged 2) bei 57.9 cM.

Die funktionelle Verteilung herunterregulierter Gene war weniger homogen, die größten funktionellen Gruppen von regulierten Genen umfassten solche, die mit Zellzyklus und Transkription (9 Gene) oder Proteinmetabolismus und -biosynthese assoziiert waren (8 Gene). Unter den herunterregulierten Genen fanden sich bspw. Cxcr4, Pten und Cyclin D2.

Die Netzwerkanalyse ergab als am besten reguliert ein funktionelles Netzwerk von 35 Genen, von denen 34 differenziell reguliert waren (Abbildung 3.53):

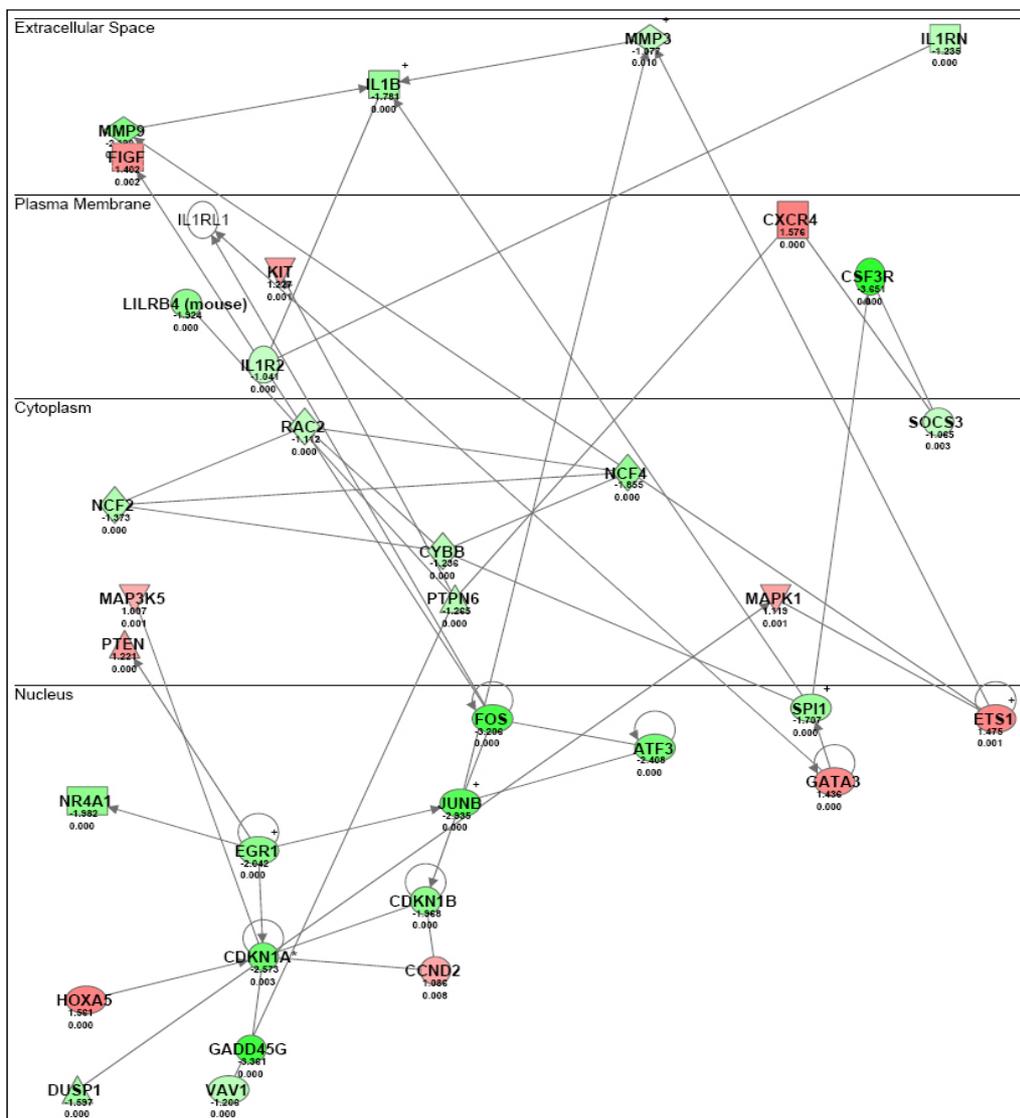


Abb. 3.53: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich naiver und scheinbehandelter resistenter Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren scheinbehandelte Tiere, so dass durch den Eingriff regulierte Gene in der Grafik gegenteilige Vorzeichen tragen.

3.9.1.2 Genexpression bei resistenten Mäusen nach Mikrofilarieninjektion im Vergleich zu scheinbehandelten Tieren

Spezifisch durch Injektion von Mikrofilarien waren bei resistenten Mäusen gegenüber Tieren mit Injektion von RPMI nur 22 Gene differenziell reguliert, davon 6 heraufregulierte. Darunter waren u. a. Tcra (T-Zellrezeptor- α -Kette) sowie CD28, das kostimulatorische Funktion für T-Zellen besitzt. Herunterreguliert waren unter anderem Cdkn1b (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), Nfatc3 (Nuclear factor of activated T-cells), Neutrophilengranulaprotein Ngp und Camp (Cathelicidin antimikrobielles Peptid). Aufgrund der geringen Anzahl regulierter Gene ergab die Netzwerk-Analyse als bestes Resultat nur ein funktionelles Netzwerk, in dem 10 differenziell regulierte Gene zu finden waren, die nur sehr indirekt miteinander verbunden sind (Abbildung 3.54).

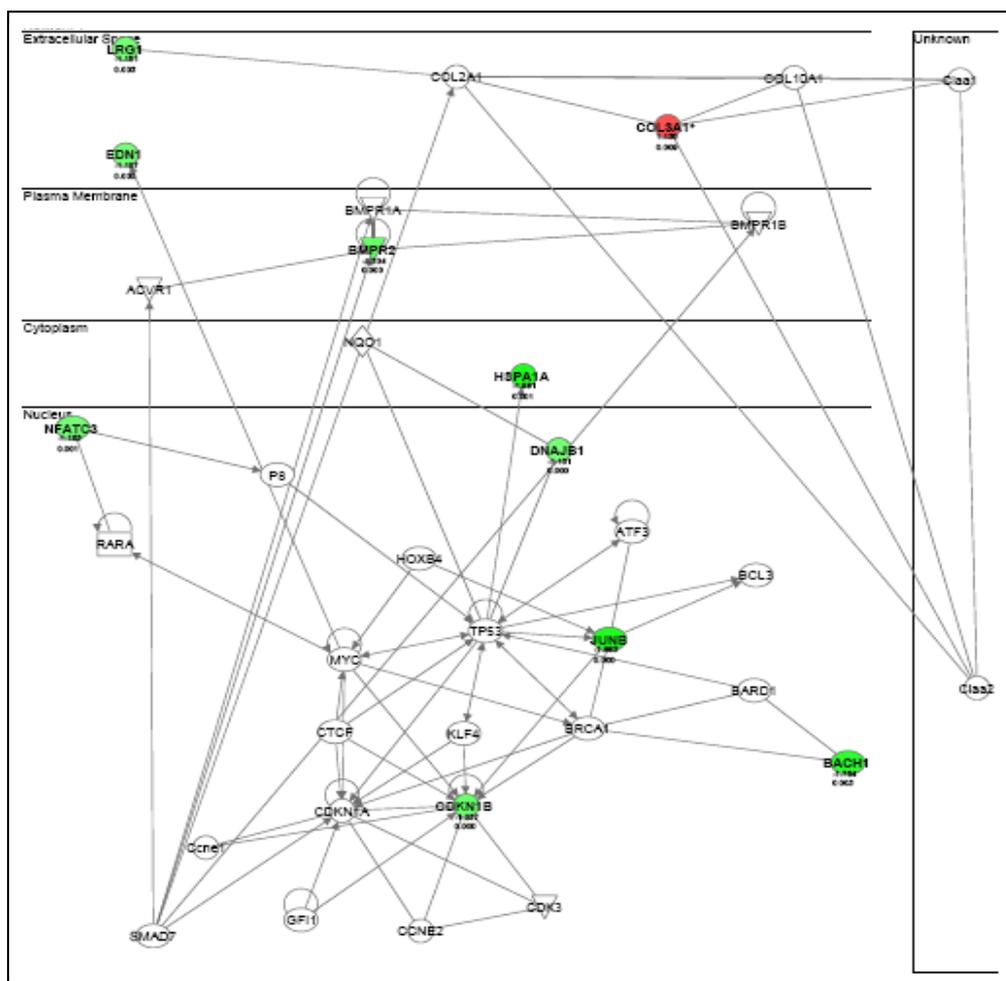


Abb. 3.54: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich mikrofilarieninfizierter und scheinbehandelter resistenter Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren Scheininfizierte.

3.9.1.3 Differenzielle Genexpression bei naiven resistenten und BALB/c-Mäusen

Um die stammesspezifischen Unterschiede im Genexpressionsverhalten resistenter und suszeptibler Tiere darzustellen, sind im Folgenden die jeweiligen Vergleiche der beiden Stämme bei den verschiedenen Infektionsstatus wiedergegeben.

Vor Infektion waren 22 Gene zwischen resistenten und suszeptiblen Tieren differenziell reguliert, davon waren je elf bei resistenten gegenüber suszeptiblen Mäusen schwächer bzw. stärker exprimierte (Tabelle 3.5):

Gensymbol	Genname	SLR
Hspa1b	heat shock protein 1B	-3.98
Hspa1a	heat shock protein 1A	-3.02
Hsp105	heat shock protein 105	-2.12
Cyp1a1	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	-2.1
Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	-1.28
Stip1	stress-induced phosphoprotein 1	-1.17
Hspa4l	heat shock 70kDa protein 4 like	-1.15
Chordc1	cysteine and histidine-rich domain (CHORD-containing, zinc-binding protein 1	-1.14
Cacybp	calcyclin binding protein	-1.14
Jag2	jagged 2	-1.06
Dnajb1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	-1.03
Ccr2	chemokine (C-C motif) receptor 2	1.01
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	1.09
Mef2c	myocyte enhancer factor 2C	1.16
Anp32a	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	1.18
S100a9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	1.2
Pten	phosphatase and tensin homolog	1.23
S100a8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	1.27
Ccnd2	cyclin D2	1.31
Cpd	carboxypeptidase D	1.34
Ddx6	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	1.34
Fzd4	frizzled homolog 4 (Drosophila)	1.57

Tab. 3.5: Bei naiven resistenten gegenüber BALB-Mäusen differenziell regulierte Gene. SLR = signal log ratio.

Vor Injektion waren mehrere Hitzeschockproteine und mit Stress assoziierte Gene bei suszeptiblen Mäusen stärker exprimiert als bei resistenten. Bei diesen hingegen wiesen mit Chemotaxis sowie Transkription assoziierte Gene stärkere Expression auf. Die geringe Anzahl regulierter Gene ergab in der Netzwerk-Analyse als bestes Resultat nur ein

funktionelles Netzwerk, in dem elf differenziell regulierte Gene zu finden waren, die nur sehr indirekt miteinander verbunden sind (Abbildung 3.55).

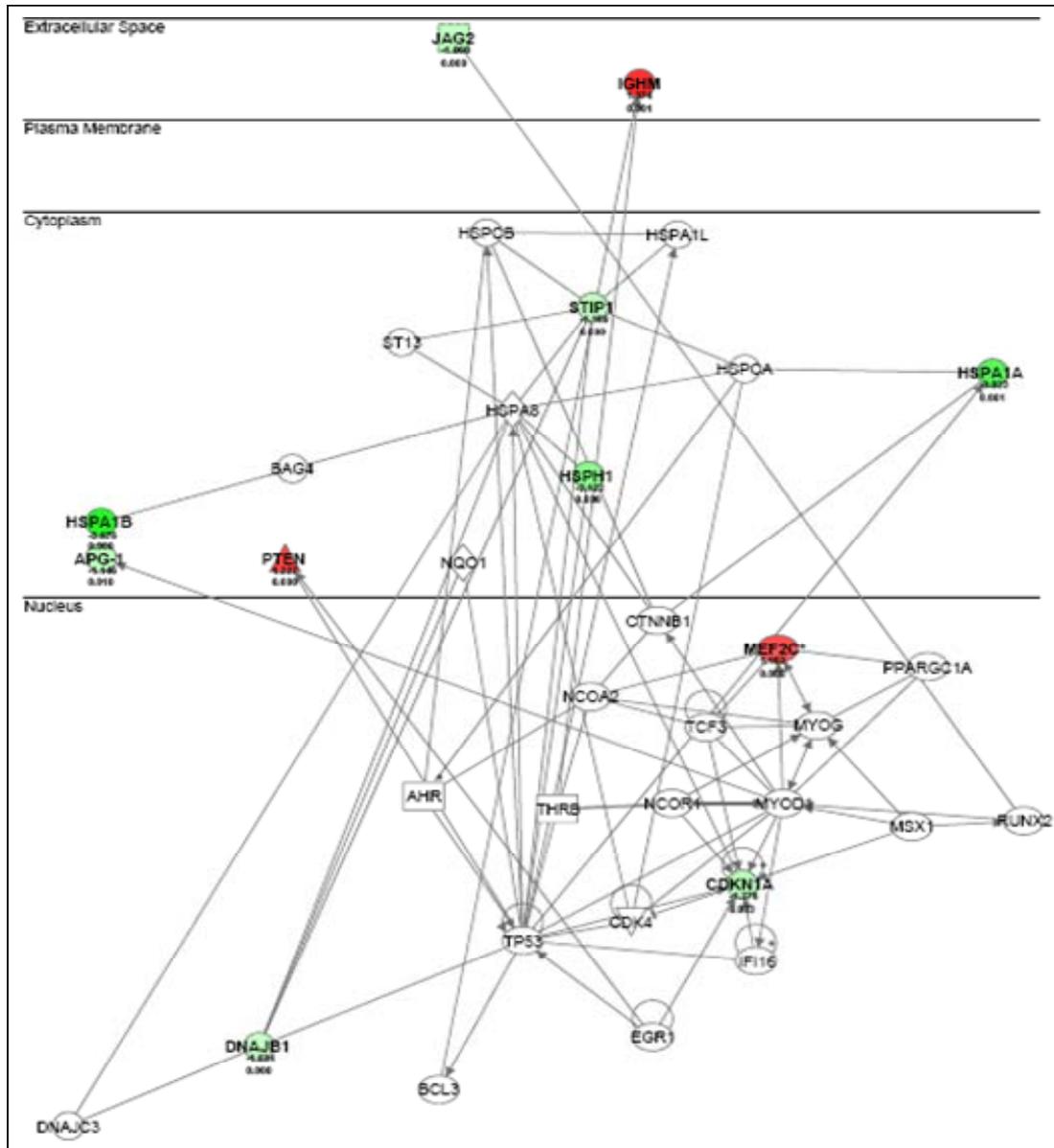


Abb. 3.55: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich naiver resistenter und naiver BALB/c-Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren BALB/c.

3.9.1.4 Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Scheinbehandlung

Der Vergleich der Genexpression scheinbehandelter resistenter und susceptibler Mäuse ergab 378 differenziell regulierte Gene, davon 86 bei resistenten schwächer und 292 stärker exprimierte. Unter den bei resistenten Tieren stärker exprimierten Genen sind die auf Chromosom 12 in Region F2 lokalisierten Crip1 (Cystein-rich protein1), Igh-4 und Igh-6 sowie Wars (Tryptophanyl-tRNA synthetase). Die Netzwerk-Analyse ergab als am besten reguliert ein Netzwerk von 35 differenziell regulierten und direkt funktionell verbundenen Genen (Abbildung 3.56):

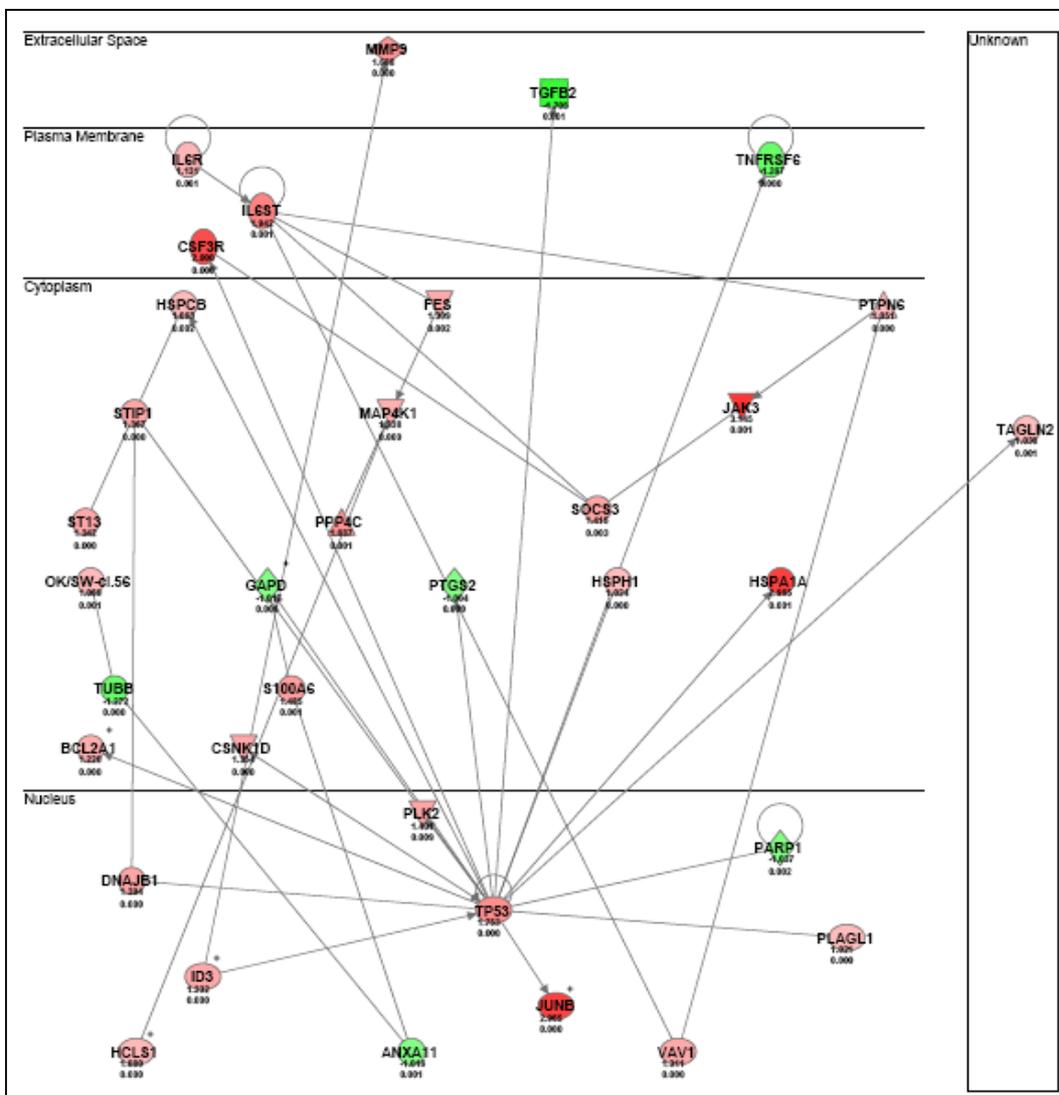


Abb. 3.56: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich scheinbehandelter resistenter und scheinbehandelter BALB/c-Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren BALB/c-Mäuse.

3.9.1.5 Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Mikrofilarieninjektion

Der Vergleich der Genexpression mit Mikrofilarien infizierter resistenter und susceptibler Mäuse ergab 80 differenziell regulierte Gene, davon 53 bei resistenten schwächer exprimierte. Hiervon waren sieben mit Transkription, zwei mit Zellzyklus assoziiert. Unter den bei resistenten Mäusen stärker exprimierten Genen waren drei Hitzeschockproteine, IL-1 β , sowie zwei S100 Kalzium-bindende Proteine. Die Netzwerkanalyse mit dem Programm Ingenuity ergab als bestreguliertes Netzwerk eines aus 35 Genen, von denen 13 differenziell reguliert waren, jedoch bestanden bei nur zwei bzw. drei Genen direkte funktionelle Verbindungen (Abbildung 3.57):

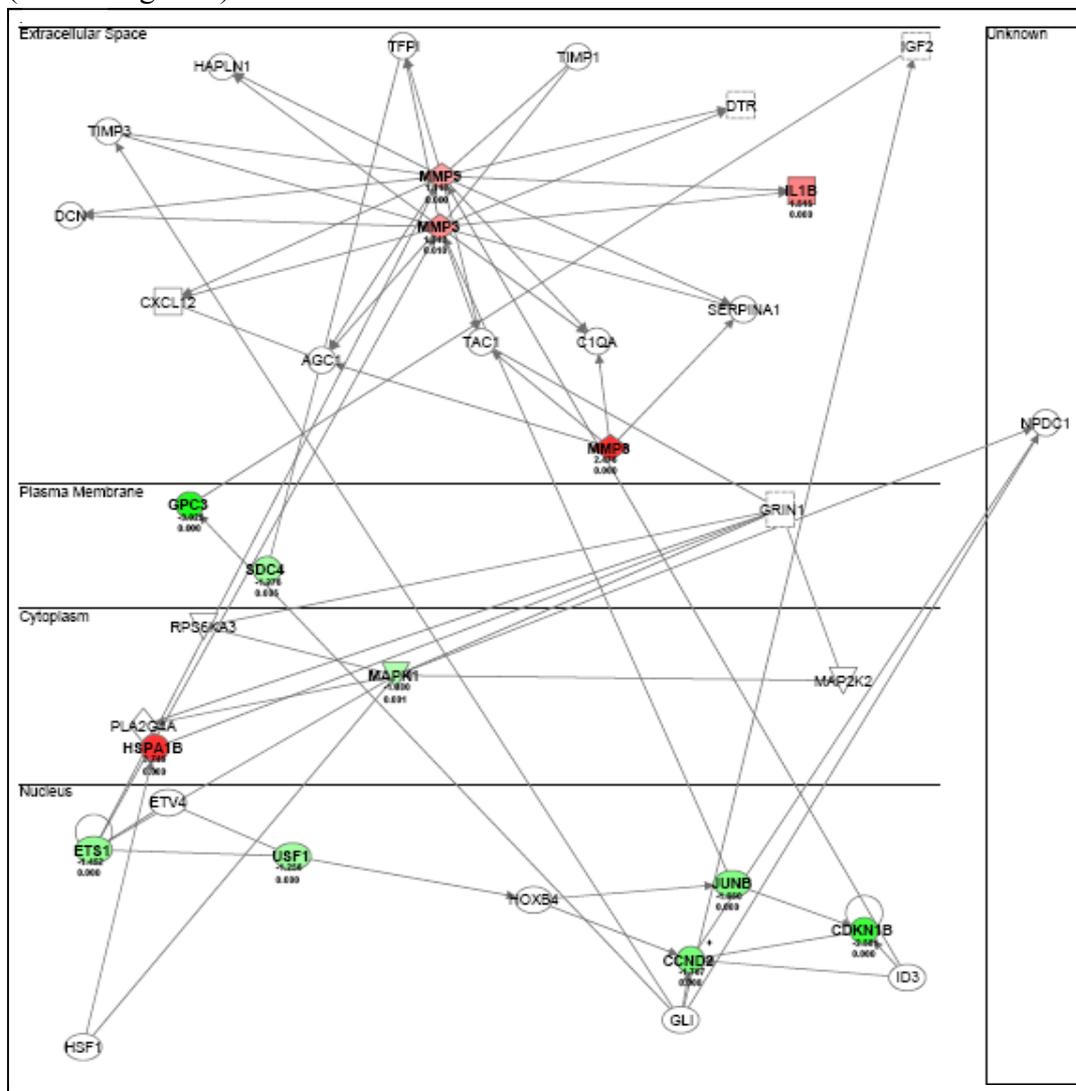


Abb. 3.57: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich mit Mikrofilarien infizierter resistenter und mit Mikrofilarien infizierter BALB/c-Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren BALB/c-Mäuse.

3.9.1.6 Cluster der Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen bei verschiedenen Infektionsstatus

Zur Darstellung des Expressionsverhaltens von Genen bei naiven, scheinbehandelten sowie mit Mikrofilarien infizierten suszeptiblen und resistenten Mäusen wurden die arithmetischen Mittel der Signalstärken entsprechender Microarrays mit der Software Genesis normalisiert und daraus 12 Cluster von Genen berechnet, die ein ähnliches Expressionsmuster zeigen (Abbildung 3.58). In die Auswertung gingen 179 Gene ein, die in mindestens einem Vergleich (unbehandelt vs. scheinbehandelt, infiziert vs. scheinbehandelt, resistent vs. suszeptibel) differenziell reguliert waren.

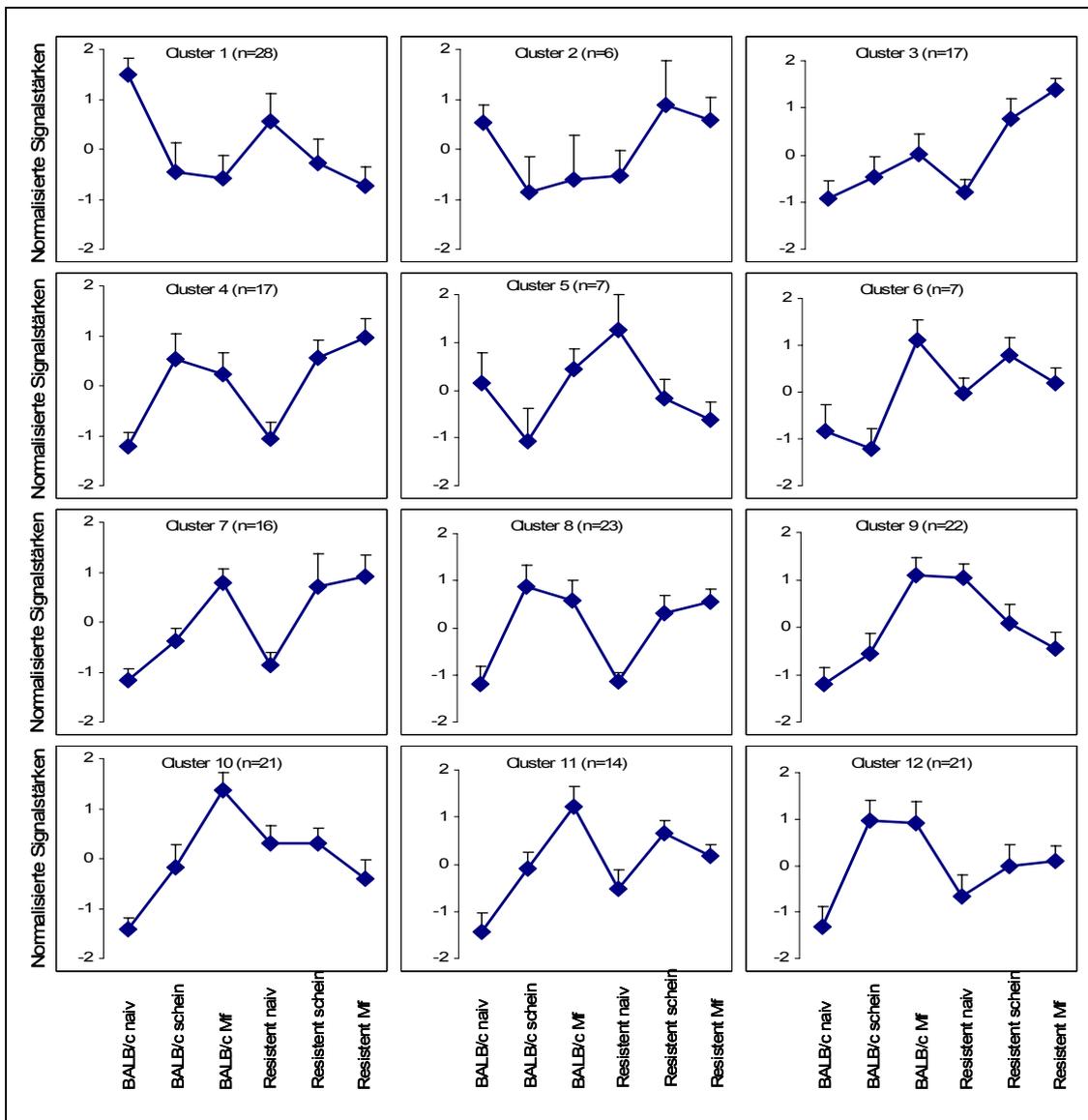


Abb. 3.58: Cluster von Genen gleichen Expressionsverhaltens bei resistenten und BALB/c-Mäusen in naivem Zustand, nach Scheinbehandlung sowie nach Mikrofilarieninjektion.

Als für den Unterschied zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen relevant kommen vor allem die Gene der Cluster 9 und 10 mit genau entgegengesetztem Expressionsverhalten bei resistenten und suszeptiblen Mäusen in Frage. Es handelt sich um 43 Gene, die bei suszeptiblen Tieren durch Scheinbehandlung sowie Mikrofilarieninjektion kontinuierlich stärker exprimiert wurden, wohingegen ihre Expression bei resistenten Tieren gegenüber naiven Tieren kontinuierlich abnahm. Bereits bei naiven Tieren lag die Expression dieser Gene bei resistenten Tieren deutlich über der Expression bei suszeptiblen Tieren. Darunter waren 13 an der Regulation von Zellzyklus und Transkription, fünf an Proteinmetabolismus, vier an Ionentransport beteiligte Gene sowie Cflar (CASP8 and FADD-like apoptosis regulator) und das an Zelladhäsion und Signaltransduktion beteiligte Alcam (activated leucocyte adhesion molecule).

Auch die Gene der Cluster 2, 5, 11 und 12 zeigten ein grundlegend unterschiedliches Expressionsverhalten bei den verschiedenen Infektionszuständen zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen. Diese 68 Gene umfassten in Cluster 2 unter anderem CXCL5 (chemokine (C-X-C motif) ligand 5) und 3 Hitzeschockproteine, in Cluster 5 waren vier an Transkription beteiligte Gene, in Cluster 11 fanden sich sechs an der Regulation von Transkription beteiligte Gene und in Cluster 12 waren vier Gene an Signaltransduktion sowie drei an Transkription und Translation beteiligt. In naivem Zustand stärker exprimiert sind bei BALB/c gegenüber resistenten Tieren die 34 Gene der Cluster 1 (u. a. Cxcr4, Rarg, Rrad) und 2, wohingegen resistente Mäuse für die 92 Gene der Cluster 5, 6, 9, 10, 11 und 12 eine deutlich stärkere Expression als BALB/c aufweisen.

3.9.1.7 Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Scheinbehandlung

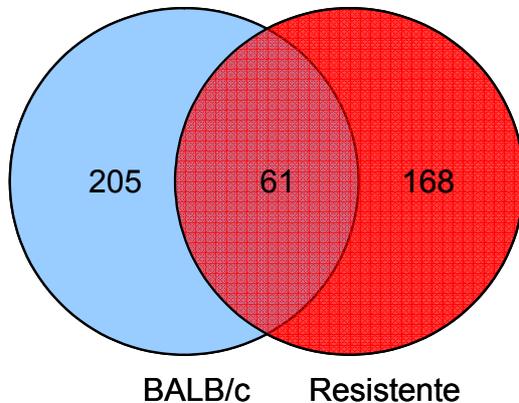


Abb. 3.59: Venn-Diagramm durch Scheinbehandlung regulierter Gene bei resistenten und BALB/c-Mäusen

Bei 61 Genen war bei sowohl bei resistenten wie auch bei BALB/c-Mäusen eine Änderung der Genexpression durch Scheinbehandlung zu beobachten (vgl. Schmidt-Oehm 2006), wobei 56 Gene in gleicher Weise, 5 Gene gegenteilig reguliert waren. Gegenteilige Expressionsänderung erfuhren *Stip1* (stress-induced phosphoprotein 1), die Hitzeschockproteine *Hsp1a*, *Hsp1b* und *Hsp110* sowie *Pdia6* (protein disulfide isomerase associated 6), die alle bei BALB/c-herauf, bei resistenten Mäusen herunterreguliert waren, wobei speziell die *Hsp1a* und *Hsp1b* mit SLR von 3 und 4.6 bzw. -3 und -3.5 sehr große Unterschiede in der differentiellen Genexpression zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen aufwiesen. Unter den in beiden Gruppen herunterregulierten 17 Genen waren unter anderem *Tnfaip1*, *Map3k5*, mit Entwicklung und Organogenese assoziierte Gene, der Chemokinrezeptor *Cxcr4* sowie Transkriptionsfaktoren.

Bei beiden Stämmen durch Scheinbehandlung einheitlich heraufreguliert waren 39 Gene, darunter *Cd79b*, *Csf3r* (colony stimulating factor 3 receptor), *Rasd1*, *Igk-C* (immunoglobuline kappa chain, v8), *Igh-6* aus der Kandidatenregion, *IL-1 β* , *Tcrb-J* (T-cell receptor β , variable 13) sowie die S100-Proteine *a8* und *a9*.

Exklusiv bei BALB/c-Mäusen waren 205 Gene reguliert (vgl. Schmidt-Oehm 2006), darunter die hochregulierten Gene *Wars*, *Crip1* und *Kns2* aus der Kandidatenregion sowie *Pik3r1*, *CD34*, *CD97* und die herunterregulierten *Blnk* (b-cell linker), *Fas* (tnf receptor superfamily member), *Traf6* und *Igj* (immunoglobuline joining region). Funktionell waren schwerpunktmäßig Gene reguliert, die mit Protein-Aminosäure-Phosphorylierung und -biosynthese, Transkription und Transportvorgängen assoziiert sind.

Bei resistenten Mäusen waren exklusiv 168 Gene reguliert. Davon waren die Gene *Igh-4* und *Jag2* aus der Kandidatenregion heraufreguliert, ebenso der Chemokinrezeptor *Ccr1* und der Chemokinligand *Ccl9*, *Nfkbia*, *Lsp1* (lymphocyte specific 1), *CD53*, *Btg2* (B-cell translocation gene), *IL-6 α* , *IL-1r2*, *IL-1r*-Antagonist und die Phospholipase *Pla2g7*. Herunterreguliert waren *Cyclin D2* und die INF-induzierte GTPase *Iigp1* sowie v. a. Gene aus den Bereichen (Ionen-) Transport, Zellzyklus und Protein-Aminosäure-Phosphorylierung.

3.9.1.8 Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Mikrofilarieninjektion

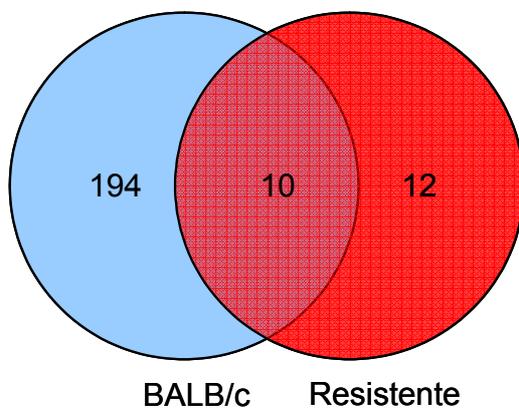


Abb. 3.60: Venn-Diagramm durch Mikrofilarieninjektion regulierter Gene bei resistenten und BALB/c-Mäusen

Bei beiden Stämmen waren 10 annotierte Gene durch Mikrofilarieninjektion reguliert. Gleichmaßen reguliert waren das Hitzeschockprotein *Hspa1b* sowie *Col3a1* (Procollagen Typ 3 α 1) und die Proteintyrosinphosphatase *Ptpn8*. Bei BALB/c herauf-, bei resistenten Mäusen herunterreguliert waren u. a. *Cdkn1b* (p27), *Jun-B*-Onkogen, *Endothelin 1*, *Nfatc3* sowie *Bmpr2*. Bei beiden Stämmen heraufreguliert war *Tera*.

Exklusiv bei BALB/c reguliert waren 194 Gene (vgl. Schmidt-Oehm 2006). Unter den 15 herunterregulierten Genen waren u. a. der Chemokinligand *Cxcl13*, *Tnfrsf6* sowie aus der RAS-Onkogenfamilie *Rab10*. Heraufreguliert waren die RAS-assoziierten *Rrad*, *Rab7* und *Rraga*, der *IL-6 α* sowie *IL-6*-Signaltransducer, *MHC-II*-Antigen *H2-Ab1* sowie *MHC-II*-Locus *H2-DMb1*, das *CD2*-assoziierte Protein *Cd2ap*, *CD3d*, *CD34*, *CD44*, *CD52*, *CD68*, *CD8b*, Chemokinrezeptor *Ccr1*, *Csf2rb*, *Cyclin D2*, *Pten*, *Pik3r1*, die T-Zellrezeptorgene *Tera* und *Tcrb-V13*, *Tnfaip1* sowie *Akt2*.

Exklusiv bei resistenten Tieren reguliert waren zwölf Gene, darunter das heraufregulierte *CD28* sowie die herunterregulierten *Socs3* (suppressor of cytokine signaling 3), das Interferon-induzierte Membranprotein 6, Neutrophilengranulaprotein, *Hspa1a* und das chemotaktische *Fpr1*.

3.9.2 Zweite Genexpressionsanalyse

In einem zweiten Infektionsexperiment wurde der Einfluss implantierter Adultweibchen auf die Genexpression bei einer nachfolgenden Mikrofilarieninjektion untersucht. Da die globale Genexpression mit stärkeren Eingriffen in das experimentelle System zunehmend komplexer wird, wird hier zuerst die Genexpression nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion beschrieben, d. h. die alleine auf den operativen Eingriff bei der Implantation zurückgehende Genexpressionsänderung gegenüber alleiniger Injektion von Mikrofilarien. Anschließend wird die Genexpression beim eigentlichen Experiment, der Implantation adulter Weibchen mit nachfolgender Injektion von Mikrofilarien, dargestellt.

3.9.2.1 Differenzielle Genexpression bei resistenten Mäusen nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion gegenüber alleiniger Mikrofilarieninjektion

Nach Injektion von RPMI in das Peritoneum und nachfolgender Mikrofilarieninjektion in resistente Mäuse waren gegenüber Tieren mit alleiniger Mikrofilarieninjektion elf Gene differenziell exprimiert, davon zwei herunter- und neun hochregulierte.

Die durch den Eingriff hochregulierten Gene umfassten unter anderem CXCL1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1), das NF- κ B-Target Birc5 (baculoviral IAP repeat-containing 5) und sechs an DNA-Metabolismus und Transkription beteiligte Gene.

Herunterreguliert waren das von Hepatocyten sezernierte Peptid-Hormon Hamp1 (hepcidin antimicrobial peptide 1) und der Transkriptionsfaktor Maff (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F).

Die Netzwerkanalyse ergab als bestreguliertes Netzwerk eines mit neun differenziell regulierten Genen, von denen Birc5 und die beiden mit Zellzyklus assoziierten Top2a und Mik67 unmittelbar in funktionellem Zusammenhang stehen (Abbildung 3.53):

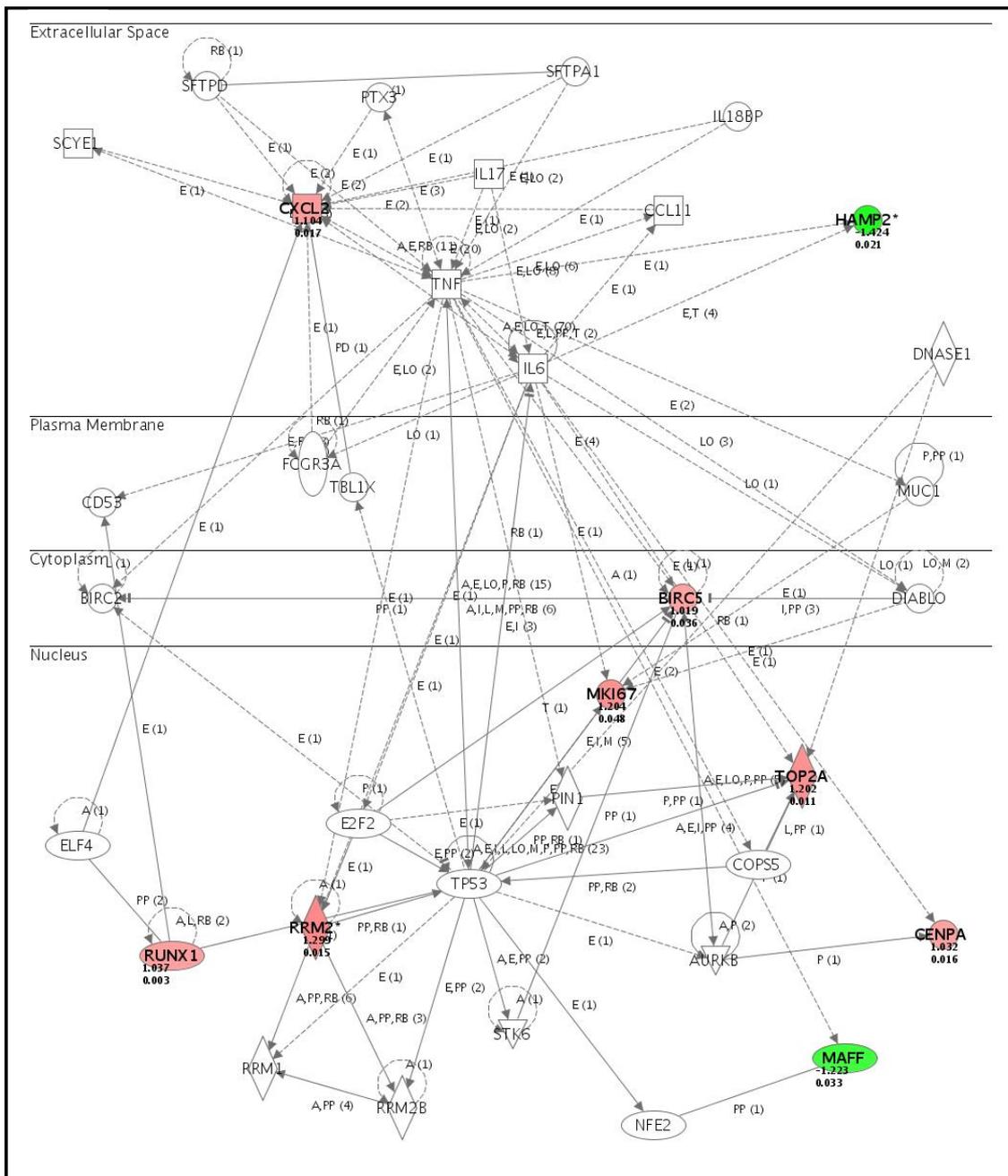


Abb. 3.61: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich resistenter Mäuse nach Scheinimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion und nur mit Mikrofilarien infizierter resistenter Mäuse differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren die nur mit Mikrofilarien infizierten Tiere.

3.9.2.2 Differenzielle Genexpression bei resistenten Mäusen nach Adultweibchenimplantation und Mikrofilarieninjektion gegenüber Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion

Spezifisch durch Adultweibchen verändert war hier die Expression von 50 annotierten Genen. Aus dem chromosomalen Bereich des postulierten Resistenzlocus waren für Igh-VJ588 (59 cM) gleich drei Probesets herunterreguliert. Herunterreguliert waren des Weiteren 16 annotierte Gene, darunter die Chemokinliganden Cxcl1 (chemokine (C-X-C motif) ligand 1, Mip2 α) und Ccl8 (chemokine (C-C motif) ligand 8), das mit Transkription assoziierte Dbp (D site albumin promoter binding protein) sowie drei in Ionentransportvorgängen involvierte Gene und das Zinkfingerprotein 469. Am stärksten herunterreguliert war CD177.

Heraufreguliert waren 33 Gene, darunter Hells (helicase, lymphoid specific) und Rrm2 (ribonucleotide reductase M2) sowie acht mit Zellzyklus assoziierte Gene, darunter Cyclin A2, ebenso Zmym1 (zinc finger, MYM domain containing 1) und Zfx1b (zinc finger homeobox 1b).

Die Netzwerkanalyse ergab als bestreguliertes Netzwerk eines mit 13 differenziell regulierten Genen (Abbildung 3.62):

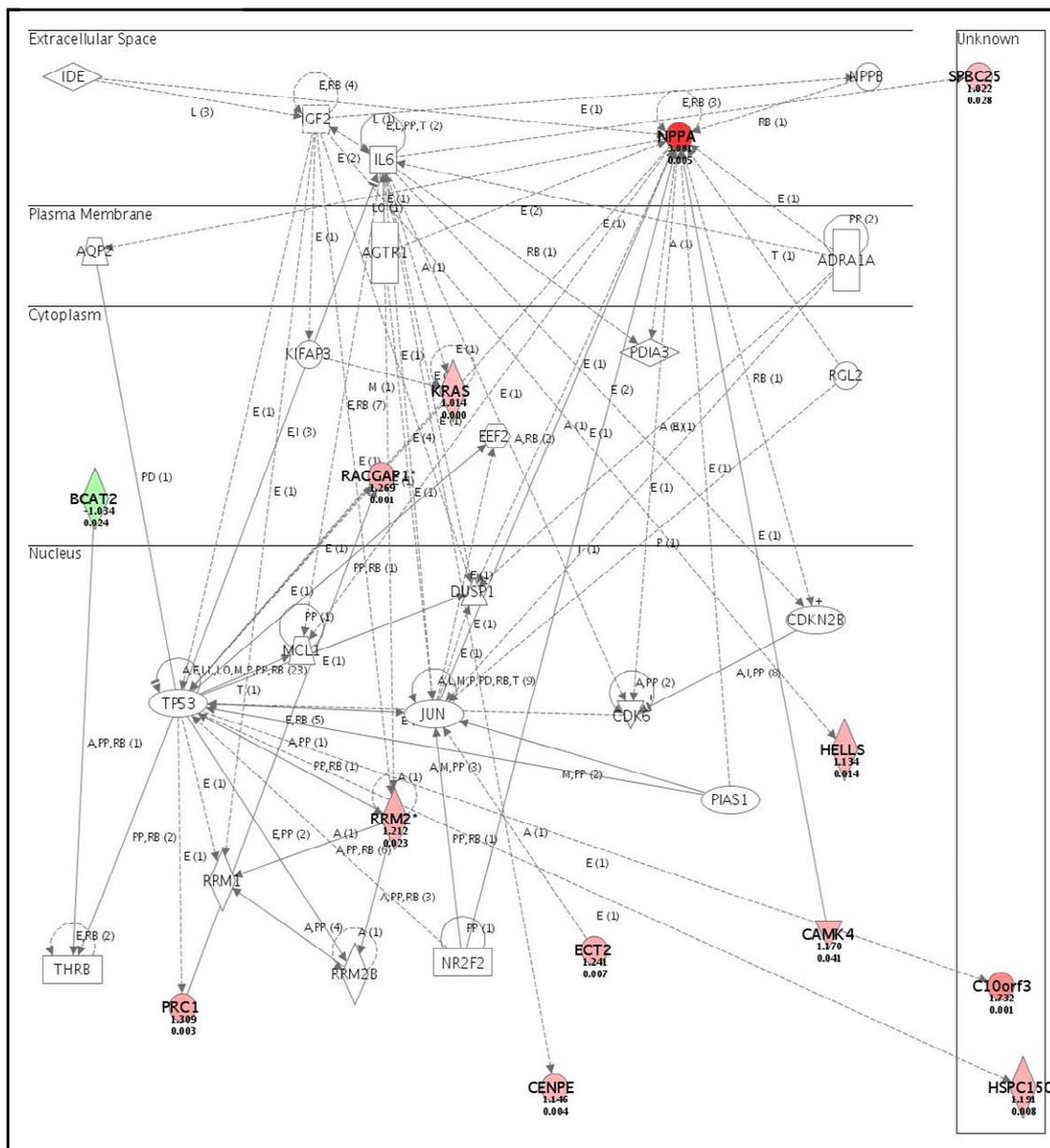


Abb. 3.62: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich resistenter Mäuse nach Adultweibchenimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion und resistenter Mäuse nach Scheinimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren infizierte Tiere nach Scheinimplantation.

3.9.2.3 Differenzielle Genexpression bei resistenten und BALB/c-Mäusen nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion

Der Vergleich von resistenten mit BALB/c-Mäusen nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion ergab insgesamt 142 differenziell regulierte Gene, wovon 55 bei resistenten eine schwächere, 87 eine stärkere Expression gegenüber BALB/c-Mäusen zeigten. Auffällig war unter den bei resistenten Tieren schwächer exprimierten Gene das Auftreten der T-Zell-spezifischen Gene Tiam1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis 1), Tcrb-J (T-cell receptor beta, joining region), Tcrb-V13 (T-cell-receptor beta, variable 13), Tcra (T-cell-receptor alpha) und Itk (IL2-inducible T-cell kinase) und Cd3 γ und δ . Außerdem waren die Expressionen von Cd5, Chemokinligand Cxcl14 sowie Bcl11b (B cell leukemia/lymphoma 11B) bei resistenten Mäusen deutlich schwächer als bei BALB/c.

Unter den gegenüber den suszeptiblen Tieren stärker exprimierten Genen waren Cdkn1a, die Chemokinliganden Ccl8, Cx3cl1 und Cxcl7, Ccbp2 (chemokine binding protein 2), Nfkbia (Nuclear factor of κ light chain gene enhancer in B-cells inhibitor α). Auffällig waren hier auch sieben Slc(solute carrier)-Gene und die an Zelladhäsion beteiligten Integrine β 6 und β -like 1. Mit zwei weiteren Transkriptionsfaktoren war auch das Zinkfingerprotein 386 aus der Kandidatenregion auf Chromosom 12 unter den bei resistenten Tieren stärker exprimierten Genen. Insgesamt fanden sich hier sieben (Ionen-)Transporter, je drei an apoptotischen Vorgängen und Signaltransduktion beteiligte sowie neun mit Proteintransport und –metabolismus assoziierte Gene.

Die Netzwerkanalyse (Abbildung 3.63) ergab als bestreguliertes Netzwerk eines mit 21 differenziell regulierten Genen, darunter die erwähnten T-Zell-assoziierten Gene sowie unter anderem Bcl2l1 (B cell leukemia/lymphoma 2-like 1).

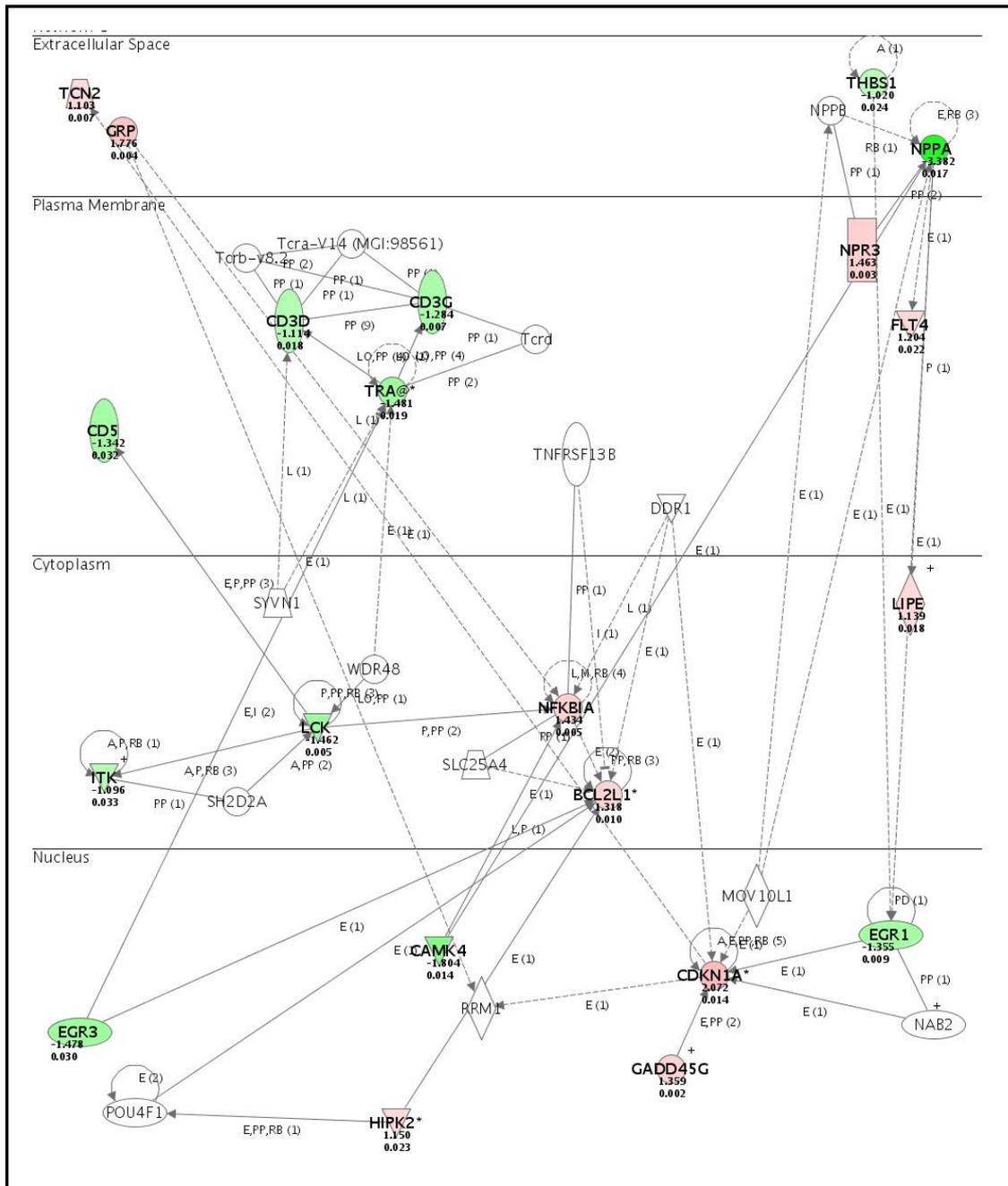


Abb. 3.63: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich resistenter Mäuse nach Scheinimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion mit BALB/c-Mäusen nach Scheinimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren BALB/c-Mäuse.

3.9.2.4 Differenzielle Genexpression von resistenten und BALB/c-Mäusen nach Adultweibchenimplantation und Mikrofilarieninjektion

97 Gene waren nach Implantation adulter Weibchen und nachfolgender Mikrofilarieninjektion bei resistenten im Vergleich zu BALB/c-Mäusen differenziell reguliert. Von diesen Genen waren 23 bei BALB/c stärker exprimiert. Hierunter fielen IL-1 β , Igl-V1 (immunoglobuline lambda chain, variable 1), das katalytische δ -Polypeptid von Pik3 (Pik3cd), der Chemokinrezeptor Ccr2, Bcl11b, ein Prostaglandinrezeptor (Ptger3) sowie Egr1 (early growth response 1), mehrere weitere Transkriptionsfaktoren und mit Zellzyklus und –wachstum assoziierte Gene.

Unter den Genen mit bei resistenten stärkerer Expression waren vier an Transkriptionsvorgängen beteiligte Gene, darunter Nfil3 (nuclear factor, IL-3 regulated) und aus der Kandidatenregion das Zinkfingerprotein 386, mit Zellzyklus assoziiert waren 19 Gene, darunter die Cycline A2 und B2, Cdc (cell division cycle) 2a, 20, 1, 5 und 8.

Das entsprechende bestregulierte Netzwerk umfasste 35 Gene, die alle differenzielle Expression zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen nach Weibchenimplantation zeigten (Abbildung 3.64):

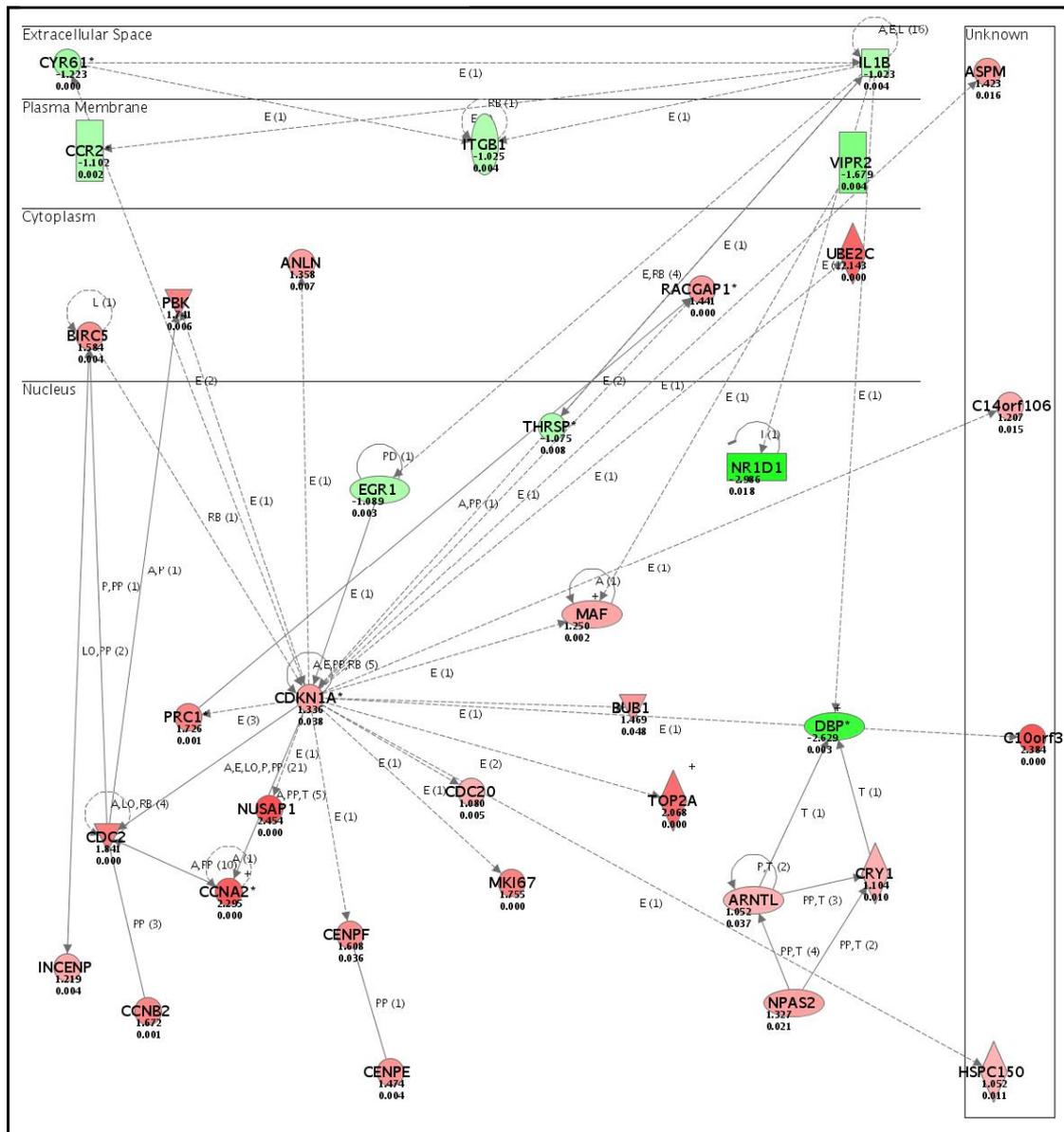


Abb. 3.64: Funktionelles Gennetzwerk im Vergleich resistenter Mäuse nach Adultweibchenimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion mit BALB/c-Mäusen nach Adultweibchenimplantation und nachfolgender Mikrofilarieninjektion differenziell exprimierter Gene. Baseline bei der Berechnung waren BALB/c-Mäuse.

3.9.2.5 Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Scheinimplantation

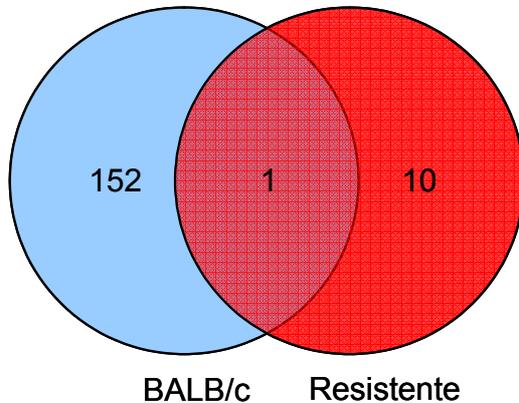


Abb. 3.65: Venn-Diagramm durch Scheinimplantation regulierter Gene bei resistenten und BALB/c-Mäusen

Nach Scheinimplantation und Mikrofilarieninjektion war bei BALB/c gegenüber alleiniger Mikrofilarieninjektion eine differenzielle Regulation der Expression von 153 annotierten Genen zu beobachten (vgl. Schmidt-Oehm 2006), wovon 55 heraufreguliert waren, darunter CD3d, CD3g, CD40, CD8b1, Ccr2, Igh-V28, Tcra, Tcrb-J und Tcrb-V13. Herunterreguliert waren unter anderem CD177, Cx3c1, Cxcl7, IgM, Nfkb1a, Ras and Rab interactor 3 sowie aus der Kandidatenregion Igh-4, Igh-VJ558 und Zfyve21.

Bei den resistenten Tieren zeigten insgesamt nur elf annotierte Gene eine signifikante Änderung ihrer Expression, exklusiv heraufreguliert war hier z. B. Cxcl1. Als einziges Gen war Hamp1 (hepcidin antimicrobial peptide 1) bei beiden Stämmen durch Scheinimplantation in seinem Expressionsverhalten verändert, wurde jedoch bei resistenten herauf-, bei BALB/c-Mäusen herunterreguliert.

3.9.2.6 Vergleich der stammesspezifischen Regulation der Genexpression durch Adultweibchenimplantation

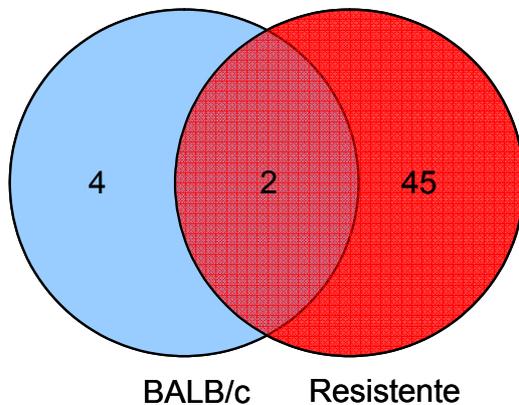


Abb. 3.66: Venn-Diagramm spezifisch durch Adultweibchen regulierter Gene bei resistenten und BALB/c-Mäusen

An spezifisch durch Adultweibchen regulierten, d. h. im Vergleich von Adultweibchenimplantation gegenüber Scheinimplantation jeweils mit nachfolgender Mikrofilarieninjektion differenziell exprimierten Wirtsgenen konnten für BALB/c nur sechs (vgl. Schmidt-Oehm 2006), für resistente Mäuse 47 annotierte Gene gefunden werden. Zwei Gene waren nach Adultweibchenimplantation bei beiden Mäusestämmen reguliert: Hells (helicase lymphoid specific) und Rrm2 (ribonucleotide reductase M2) mit Funktionen in der Lymphozytenentwicklung bzw. bei der DNA-Replikation. Beide Gene waren bei resistenten Mäusen durch Adultweibchen herauf-, bei BALB/c-Mäusen herunterreguliert.

Exklusiv bei resistenten Tieren herunterreguliert waren u. a. CD177, Cxcl1, Ccl8 und aus der Kandidatenregion Igh-VJ558, heraufreguliert waren bspw. Cyclin D2 und die Procollagene Col3a1 und Col5a2.

4 Diskussion

4.1 Vererbung der innaten Resistenz gegenüber injizierten Mikrofilarien von *L. sigmodontis* bei Kreuzungen von DBA/1- und BALB/c-Mäusen

DBA/1-Mäuse sind in der Lage, intravenös injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis* teilweise schon innerhalb eines Tages nach der Injektion vollständig aus dem peripheren Blut zu eliminieren, während sie im Blut von BALB/c-Mäusen zum Teil mehr als einen Monat zirkulieren (siehe auch Bereth 2000; Hoffmann *et al.* 2001), so dass BALB/c als suszeptibel und DBA/1 als innat resistent definiert werden. Als resistent werden für Kreuzungen von DBA/1 und BALB/c im Folgenden Nachkommen angesehen, wenn vier Tage nach der Injektion keine Mikrofilarien mehr im peripheren Blut nachweisbar waren.

Die Kreuzung eines BALB/c-Männchens mit einem DBA/1-Weibchen brachte F1-Nachkommen hervor, die alle wie DBA/1 innerhalb eines Tages nach der Injektion der Mikrofilarien diese eliminiert hatten. Dieses ausschließliche Auftreten resistenter F1-Nachkommen entspricht der 1. Mendelschen Regel (Uniformitätsregel) bei Annahme einer dominanten Vererbung der Resistenz. Die F1 wurde mit BALB/c rückgekreuzt, worauf hin es in der N2 zur Aufspaltung in resistente und suszeptible Tiere im Verhältnis 1:1 kam. Die prozentualen Anteile resistenter und suszeptibler Nachkommen aller folgenden Rückkreuzungsgenerationen stimmten sehr gut oder exakt mit dem nach der 2. Mendelschen Regel (Spaltungsregel) zu erwartenden Verhältnis von 1:1 überein. Ein Intercross nur der resistenten Tiere der N7 erbrachte resistente und suszeptible Nachkommen. Die Rückkreuzung der resistenten Tiere dieser N7F1 mit BALB/c führte für manche Verpaarungen zu uniform resistenten Nachkommen, für andere jedoch auch zu wiederum in resistente und suszeptible Tiere aufspaltenden Würfen. Elterntiere mit uniform resistenten Nachkommen wurden als homozygot resistent betrachtet und es wurde mit diesen Tieren untereinander verpaart die Zucht eines homozygot resistenten Inzuchtstammes begonnen. Auch basierend auf der N14 wurde ein homozygot resistenter, momentan in Inzucht befindlicher Stamm begründet, daneben auch ein suszeptibler. Auch die Anteile resistenter und suszeptibler Nachkommen für den Intercross heterozygot resistenter Tiere der N7 und N14 entsprachen fast exakt einer hier zu erwartenden 3:1-Aufspaltung. Untereinander

verpaart brachten sowohl als homozygot resistent wie auch als homozygot suszeptibel betrachtete Tiere erwartungsgemäß wiederum entweder nur resistente oder nur suszeptible Nachkommen hervor.

Im hier vorgestellten Modell kann eine geschlechtsgekoppelte Vererbung ausgeschlossen werden, da für die ersten Rückkreuzungsgenerationen BALB/c-Männchen, für die späteren jedoch BALB/c-Weibchen mit entsprechenden heterozygot resistenten Partnern verwendet wurden, ohne dass dies Auswirkungen auf die Nachkommen gehabt hätte, was das Verhältnis von resistenten zu suszeptiblen Tieren und die Ausprägung der Phänotypen betrifft.

Aus den vorliegenden Kreuzungsergebnissen kann daher für die Vererbung der Resistenz nach der hier verwendeten Definition sehr wahrscheinlich ein monogener, autosomaler und dominanter Erbgang angenommen werden. Danach ist zwar noch eine Beteiligung mehrerer unmittelbar benachbarter, gekoppelter Gene möglich, eine essenzielle Mitwirkung etwa auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisierter Gene kann jedoch ausgeschlossen werden. Durch die serielle Rückkreuzung erhält man definitionsgemäß bereits nach zehn Generationen kongene Tiere, hier wurden diese Rückkreuzungen noch weitergeführt. In die Genomanalysen gingen Tiere bis zur N15 mit ein, die unter der Annahme einer rein rechnerischen Homozygotie von rund 99.994 % aller rund 30 000 Gene des Mäusegenoms theoretisch lediglich in einem einzigen Gen oder Locus, dem Mikrofilariämieresistenzlocus (*mfr*), von den suszeptiblen BALB/c abweichen. Auch wenn völlige (Iso-)Kongenität auf diesem Wege nicht zu erreichen ist (Silver 1995), so ist doch von einem äußerst geringen Grad genetischer Abweichung zwischen resistenten kongenen und BALB/c-Mäusen auszugehen. Damit übereinstimmend konnte durch die Kreuzungsversuche von DBA/2- und BALB/c-Mäusen gezeigt werden, dass es möglich ist, auf überwiegend resistentem genetischem Hintergrund suszeptible Tiere zu erzeugen, was wiederum nicht für eine Beteiligung weiterer Gene oder Loci spricht, außerdem kann konkret eine Abweichung der rückgekreuzten resistenten Tiere gegenüber BALB/c im *H-2*-Haplotyp aufgrund der erfolgreich verlaufenen Hauttransplantationen zwischen kongenen Tieren ausgeschlossen werden.

4.2 Der Mikrofilariämieresistenzlocus *mfr*

Die genomweite Mikrosatellitenanalyse von 39 resistenten N2-Tieren aus der oben beschriebenen Kreuzung von BALB/c und DBA/1 ergab hoch signifikante Zusammenhänge ($p < 0.001$) zwischen den beobachteten Phänotypen und genetischen Markern auf den Chromosomen 3 (D3Mit67), 9 (D9Mit336, D9Mit355) und 12 (D12Mit133, D12Nds2), wobei die beiden Marker auf Chromosom 12 die rechnerisch geringsten Distanzen (2.56 bzw. 2.63 cM) zum postulierten Mikrofilariämieresistenzlocus aufwiesen. In weitere Linkage-Analysen gingen auch resistente Tiere höherer Rückkreuzungsgenerationen ein, die teilweise wie beschrieben theoretisch lediglich in einem einzelnen Gen, tatsächlich eher nur einem einzigen Chromosomenabschnitt, dem *mfr* (*microfilaraemia resistance locus*), von suszeptiblen BALB/c abweichen. Auch bei diesen Tieren konnten für genetische Marker auf Chromosom 12 Kopplungen mit *mfr* beobachtet werden. Am wahrscheinlichsten ist danach eine Lage des *mfr* distal von D12Mit133. Weitere Untersuchungen mit teilweise anderen Markern für Chromosom 12 an insgesamt 255 resistenten und suszeptiblen N2-Tieren sowie 110 über 7 bis 15 Generationen rückgekreuzten Mäusen ergaben eine wahrscheinliche Lage von *mfr* zwischen D12Mit133 und D12Mit144 nahe der Marker D12Nds2 und D12Mit150, d. h. zwischen 56 und 61 cM oder 105.77 Mb und 114.86 Mb distal des Centromers in der cytogenetischen F2-Bande.

Aufgrund der definitionsgemäß hohen genetischen Übereinstimmung zwischen BALB/c- und kongenen resistenten Mäusen können daher Loci auf den Chromosomen 3 und 9 als primär ursächlich für die genetische Determination der innaten Resistenz ausgeschlossen werden. Loci auf diesen Chromosomen können allerdings als Modulatoren der Resistenz angenommen werden. DBA/1-Mäuse sowie die F1-Nachkommen der Kreuzung von DBA/1 und BALB/c zeigen eine extrem schnelle Elimination injizierter Mikrofilarien häufig innerhalb eines Tages. Der Verlauf der Mikrofilariämien resistenter Tiere der nachfolgenden Rückkreuzungsgenerationen ist bei Zusammenfassung der arithmetischen Mittel demgegenüber etwas verzögert, jedoch lassen sich bei verschiedenen höheren Rückkreuzungsgenerationen mehrere Untergruppen resistenter Tiere mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten des Mikrofilarienabbaus signifikant voneinander unterscheiden. Demnach ist für die Ausprägung einer Resistenz nach der hier verwendeten Definition, wonach das periphere Blut resistenter Tiere vier Tage nach Injektion mikrofilarienfrei sein muss, alleine der *mfr* auf Chromosom 12 bzw. dort das entsprechende Allel von DBA/1 verantwortlich und essenziell. Die anderen Loci auf den Chromosomen 3 und 9 scheinen dann bei Vorhandensein

ebenfalls des jeweiligen Allels von DBA/1 zu einer noch rascheren Eliminierung der injizierten Mikrofilarien in definitionsgemäß resistenten Mäusen beizutragen. Auch diese DBA/1-Allele müssen sich dominant gegenüber den entsprechenden BALB/c-Allelen verhalten, da die F1 uniform einen ebenso ausgeprägten resistenten Phänotyp zeigt wie DBA/1. Ähnliche Verhältnisse konnten Ohno *et al.* (2002) für Infektionen mit dem Nematoden *Angiostrongylus costaricensis* hinsichtlich der Unterschiede in der Mortalität ebenfalls in Labormäusen zeigen. Hier führte eine genomweite Mikrosatellitenanalyse an F2-Tieren der Kreuzung von A/J-Mäusen, die eine Überlebensrate von 90.5 % fünf Wochen nach der Infektion zeigen, mit SM/J-Mäusen, die eine stark verminderte Überlebensrate von 33.3 % aufweisen, zur Definition eines *Angiostrongylus costaricensis* nematode susceptibility locus (*Acsns*) im telomeren Bereich von Chromosom 19, wobei zwei weitere Loci auf den Chromosomen 13 und 17 epistatische Effekte auf die Überlebensrate des Wirtes zeigen. In der entsprechenden Region auf Chromosom 19 und der syntenen Region des humanen Chromosoms 10 sind allerdings keine Gene lokalisiert, bei denen ein Einfluss der Wirtsantwort bei Infektionen bekannt wäre. Interessanterweise zeigte eine andere Untersuchung an rekombinanten Inzuchtmäusen (SMXA RI) zwar ebenfalls eine Beteiligung von Loci auf den Chromosomen 13 und 17, nicht jedoch des *Acsns* auf Chromosom 19, sondern weiterer Loci auf den Chromosomen 6 und 10 (Ishih *et al.* 2000).

In der vorliegenden Arbeit traten in späteren Generationen durch Rekombinationen sicher andere Allelkombinationen der Loci auf den Chromosomen 3 und 9 auf, so dass diesbezüglich nur noch ein kleinerer Teil der Nachkommen mit DBA/1 oder der F1 übereinstimmte. Möglicherweise kam es auch bei der Auswahl der Zuchttiere in jeder Generation zum Verlust von DBA/1-Allelen der Loci auf den Chromosomen 3 und 9. Zur Vermeidung technisch bedingt falscher Phänotypisierungen wurden in der Regel solcher Tiere zur Weiterzucht verwendet, die sich bei möglichst hohem Ausgangswert der Mikrofilariendichte unmittelbar nach der Injektion als nach zwei oder drei Tagen mikrofilarienfrei erwiesen. Tiere mit sehr niedrigen Startwerten sowie bereits nach einem Tag nicht mehr nachweisbaren Mikrofilarien wurden üblicherweise nicht zur Zucht eingesetzt, da hier auch technische Fehler denkbar wären, so etwa eine Injektion von wesentlich weniger als 50 000 Mikrofilarien.

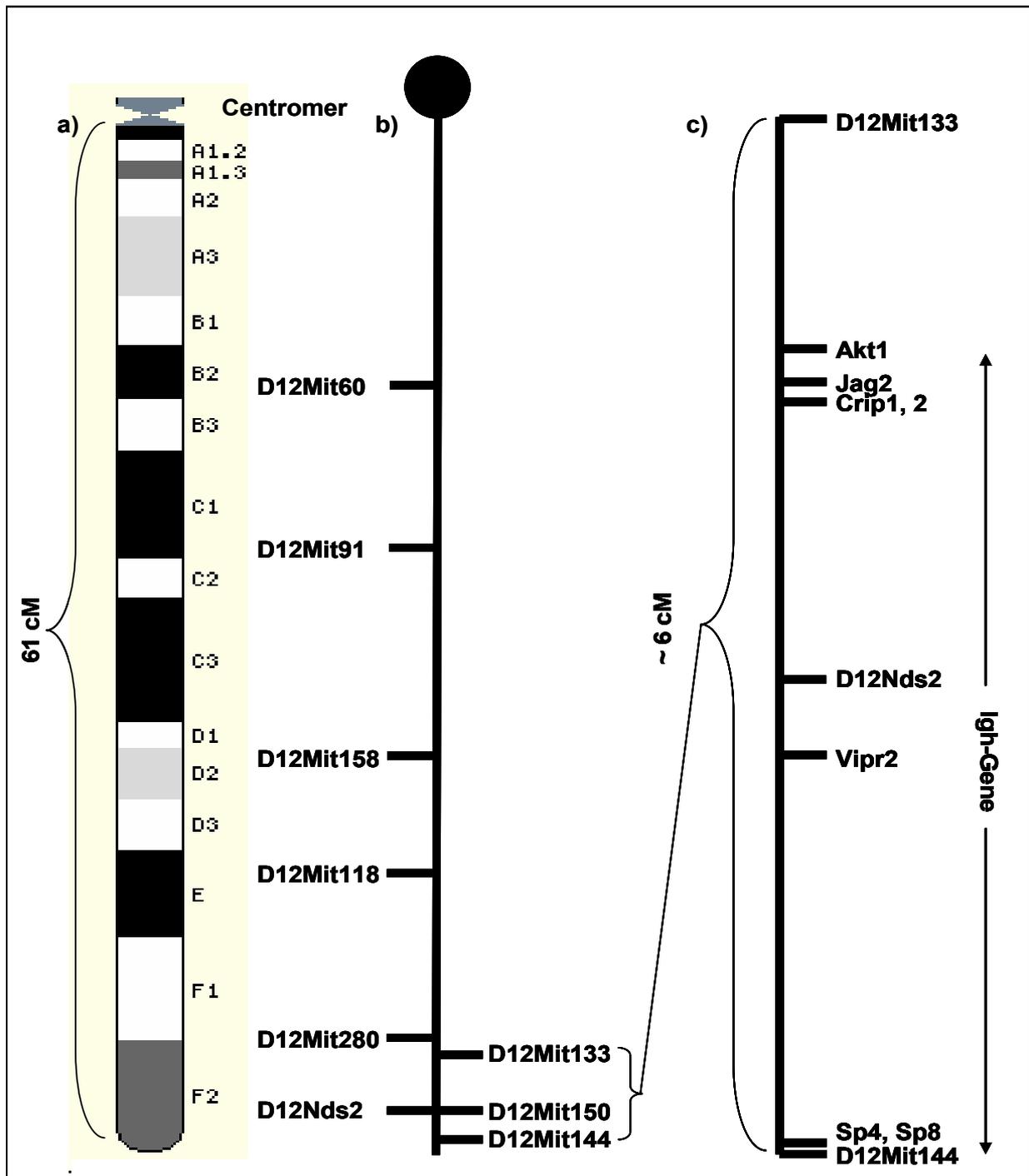


Abbildung 4.1: a) Übersicht über das gesamte Chromosom 12 mit den cytogenetischen Banden. b) Übersicht über die zur Genomanalyse verwendeten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 12. c) Detailansicht des für die Lage des *mfr* berechneten Chromosomenabschnittes mit einigen der dort lokalisierten Genen zwischen den Mikrosatellitenmarkern D12Mit133 und D12Mit144.

Momentan umfasst der entsprechende Abschnitt auf Chromosom 12 wie in Abbildung 4.1 dargestellt noch rund 6 cM. Die dort verzeichneten Gene sind nur ein kleiner Teil der in dieser Region lokalisierten. NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) weist aktuell unter anderem die im Folgenden behandelten Gene für diesen Chromosomenabschnitt aus, die damit zunächst als mögliche Kandidaten in Frage kommen.

In diesem chromosomalen Bereich liegen bspw. die Gene für **Traf3** (TNF-Rezeptor-assoziiertes Faktor 3) und **TNFAip** (TNF- α -induziertes Protein). Traf3 ist ein wichtiger Regulator der Interferon-Produktion bei einer T_H1 -Immunantwort und spielt damit eine wesentliche Rolle bei der innatens Immunantwort auf verschiedene Infektionen. TNF- α selbst ist ein typisches Zytokin einer T_H1 -Antwort, wie sie ja auch durch Mikrofilarien induziert wird. Garside *et al.* (1996) sehen einen positiven Effekt von TNF- α in der Induktion von Apoptose in helminthischen Parasiten. Von Makrophagen produziertes TNF aktiviert bei muriner Schistosomiasis Eosinophile, die dann den Helminthen attackieren (Playfair & Taverne 1987).

Jagged 2 ist ein Ligand für Notch-Rezeptoren (Shimizu *et al.* 2000). Notch wirkt unter anderem protektiv bei über den T-Zell-Rezeptor vermittelter Apoptose von T-Zellen (Jehn *et al.* 1999) und beeinflusst auch die T-Zelldifferenzierung in $CD4^+$ - und $CD8^+$ - bzw. α - β - und γ - δ -T-Zellen (Fowlkes & Robey 2002; Washburn *et al.* 1997), ebenso wie die Differenzierung von myeloiden Stammzellen zu Granulozyten *in vitro* (Milner *et al.* 1996). Der Notch-Signalweg beeinflusst auch die Ausprägung v. a. einer T_H2 -Immunantwort, so sind Mäuse mit einem Defekt im Notch-Signaling von $CD4^+$ -T-Zellen nicht in der Lage, eine protektive Immunantwort gegen den gastrointestinal parasitierenden *Trichuris muris* auszubilden (Tu *et al.* 2005).

Akt 1 (PKB- α) ist eine Serin-Threonin-Kinase mit wesentlichen Funktionen in verschiedenen zellulären Prozessen. Durch Phosphorylierung aktiviertes Akt liefert Survivalsignale, die Zellen vor durch Stress induzierter Apoptose schützen (Downward 1998). Eine Infektion mit dem intrazellulär parasitierenden Protozoon *Toxoplasma gondii* führt beispielsweise über Aktivierung von Akt *in vitro* wie *in vivo* zur Resistenz von Zellen gegenüber verschiedensten proapoptotischen Signalen (Kim & Denkers 2006).

Crip1 und **Crip2** gehören zu einer Gruppe cysteinreicher Proteine, die Einfluss auf das Zytokingleichgewicht unter Bevorzugung eines T_H2 -Milieus nehmen können. Ihre starke Expression in Zellen des Immunsystems im Vergleich zu sonstigen Zelltypen legt eine Rolle in der Wirtsabwehr nahe (Hallquist, Khoo & Cousins 1996). Im Tiermodell führt eine Überproduktion von Crip zu abnehmenden IFN- γ - und IL-2-Konzentrationen, wohingegen eine Zunahme von IL-6 und IL-10 zu beobachten ist (Lanningham-Foster *et al.* 2002).

Siva (CD27 binding protein) kodiert ein proapoptotisches Protein, das für die in stimulierten T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor induzierte Apoptose (AICD = activation-induced cell death) notwendig ist. Es hat einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität von NF- κ B und spielt auch eine Rolle bei der peripheren Toleranz und T-Zell-Homeostase (Gudi *et al.* 2006). CD27 gehört zu einer Familie cysteinreicher Rezeptoren unter anderem auf B-Zellen und peripheren T-Zellen. Filarien induzieren die Freisetzung von löslichem CD27 durch aktivierte T-Zellen, insbesondere bei Elefantiasispatienten und mikrophilarienpositiven Individuen ist hierfür ein signifikanter Anstieg zu beobachten (Yazdanbakhsh *et al.* 1993).

Des Weiteren ist in der Kandidatenregion der Komplex der Gene für die schweren Ketten der Immunglobuline lokalisiert, dies sind im einzelnen Igh-1a (Serum-IgG2a), Igh-2 (Serum-IgA), Igh-3 (IgG2b), Igh-4 (IgG1), Igh-5 (delta like heavy chain), Igh-6 (IgM), Igh-7 (IgE), Igh-8 (IgG3), Igh-C (constant region), Igh-D (diversity region) und Igh-J (joining region). Als Kandidatengen wäre v. a. **Igh-6** interessant, das für die schweren Ketten bei IgM kodiert. Antikörper der Klasse IgM stellen den größten Anteil sog. natürlicher oder spontaner Antikörper dar, d. h. solcher Antikörper, die v. a. von peritonealen B1-Zellen naiver Tiere sekretiert werden, es sind allerdings auch solche vom Typ IgA und IgG beschrieben (Avrameas 1991; Herzenberg & Kantor 1993). Natürlichen Antikörpern werden u. a. Rollen in der innate Immunantwort, der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation zugeschrieben (Ochsenbein *et al.* 1999). Des Weiteren sind opsonierende Antikörper der Klasse IgM *in vivo* notwendig für die durch Komplement vermittelte Phagozytose apoptotischer Zellen (Ogden *et al.* 2005). In Igh-6^{-/-}-Mäusen ist die Ausbildung einer protektiven T_H1 -Immunantwort in der frühen Phase einer experimentellen Salmonelleninfektion beeinträchtigt, die Produktion von INF- γ durch T-Zellen ist stark vermindert (Ugrinovic *et al.* 2003).

Bei all diesen Genen mit bekannten Funktionen, die eine Rolle bei der Vermittlung der innaten Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien möglich erscheinen lassen, sowie weiteren in der Kandidatenregion lokalisierten Genen sind zwischen phänotypisch resistenten und suszeptiblen Tieren Unterschiede denkbar. Diese können als stille Mutationen ohne Auswirkung und damit irrelevant für die Resistenz sein, wenn das Genprodukt trotz Unterschieden in der DNA-Sequenz unverändert bleibt, oder wenn bei neutralen Mutationen ein leicht verändertes Genprodukt keine andere Wirkung hervorruft. Solche zwischen BALB/c und kongenen resistenten Tieren polymorphen Gene scheiden dann als Kandidaten aus. Ebenso kann jedoch auch eine nur eingeschränkte Funktionalität bis zum kompletten Verlust der Wirksamkeit eines der Genprodukte die Folge sein, genauso wie auch bei gleichem Produkt dessen Menge verändert sein kann, d. h. die phänotypisch unterschiedlichen Tiere weisen auch eine unterschiedliche Expression der betreffenden Gene auf. Denkbar ist auch ein völliger Verlust des Genprodukts durch eine Nonsense-Mutation. Aufgrund der bisherigen Genomanalysen ist noch keine weitere Festlegung auf einzelne, wahrscheinliche Kandidatengene möglich, die entsprechenden Datenbanken wie die der Jackson Laboratories weisen in diesem Bereich auch keine bekannten Polymorphismen zwischen BALB/c und DBA/1 aus, jedoch lassen sich für einzelne Gene teilweise Zusammenhänge zwischen Genom- und Genexpressionsanalysen annehmen.

4.3 Genexpression *mfr*-kongener Mäuse bei unterschiedlichen Infektionsstatus

Die Genexpression von Mikrofilariämie-resistenten Mäusen sowie von suszeptiblen BALB/c-Mäusen wurde mittels cDNA-Microarrays vor und nach Mikrofilarieninjektion untersucht. In einem weiteren Experiment wurde die Genexpression beider Mäusestämme bei gleichzeitiger Anwesenheit von adulten Filarienweibchen und nachfolgend injizierten Mikrofilarien analysiert.

In naivem Zustand konnten nur wenige, aber möglicherweise wesentliche Unterschiede in der globalen Genexpression zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen festgestellt werden. Lediglich 22 Gene wiesen hier eine differenzielle Expression auf, darunter interessanterweise das in der Kandidatenregion lokalisierte Jagged 2, das bei BALB/c vermehrt exprimiert war,

sowie der mit dem ebenfalls in der Kandidatenregion liegenden Akt1 assoziierte Tumorsuppressor Pten, der bei resistenten Tieren stärkere Expression aufwies. Der Akt-Signalweg spielt unter anderem eine wichtige Rolle hinsichtlich des Überlebens von T-Zellen, wobei antiapoptotische Signale u. a. über CD28 vermittelt werden (Jones *et al.* 2002). Pten hat hierzu eine antagonistische Rolle und führt damit zu apoptotischen Prozessen (Stambolic *et al.* 1998; Maehama & Dixon 1998). Ebenfalls bei naiven resistenten Tieren stärker exprimiert waren der Apoptose-Regulator Cflar (cFlip), der die Signalübertragung über Todesrezeptoren inhibiert und für das Überleben und die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor notwendig ist (Budd, Yeh & Tschopp 2006), Cyclin D2, das im Besonderen bei B-Zellen den Übergang des Zellzyklus von G1- und S-Phase induziert (Reid & Snow 1996), sowie S100a8 und S100a9 (Calgranulin A und B), die unter inflammatorischen Bedingungen von Neutrophilen freigesetzt werden und in verschiedenen Zelltypen Apoptose induzieren (Nakatani *et al.* 2005). Die differenzielle Expression so weniger Gene bei gleichzeitiger Konzentration auf immunologisch relevante oder in der Kandidatenregion lokalisierter bzw. mit solchen assoziierter Gene spricht für einen tatsächlich sehr hohen Grad der Übereinstimmung der kongenen Stämme hinsichtlich Genetik wie auch Genexpression.

Durch **Scheinbehandlung**, d. h. die alleinige Injektion von RPMI ohne Mikrofilarien, waren bei resistenten wie bei BALB/c-Mäusen weit über 200 Gene gegenüber den naiven Tieren differenziell exprimiert. Bei beiden Stämmen gleichermaßen heraufregulierte Gene, die damit als unspezifisch durch den operativen Eingriff reguliert angesehen werden können, waren unter anderem das proinflammatorische IL-1 β , CD79b (Ig β), das neben Iga eine Untereinheit des B-Zell-Antigenrezeptors darstellt und wie dieses für volle Funktionalität von B-Zellen essenziell ist (Wienands & Engels 2001) sowie beide oben genannten S100-Proteine. Interessanterweise bei beiden Stämmen durch Scheinbehandlung ebenfalls heraufreguliert waren zugleich die Transkriptionsfaktoren Fos und JunB wie auch die Zellzyklusregulatoren Cdkn1a (p21, Cip1) und Cdkn1b (p27, Kip1) und der T_H1-assoziierte Csfr3 (= CD114), ein Rezeptor für den Colony stimulating factor CSF. CSF bewirkt z. B. in Makrophagen als Reaktion auf mitogene Stimuli ein Fortschreiten des Zellzyklus von der G1- zur S-Phase, wobei auch IL-1 β auf Makrophagen stimulierend auf die Ausbildung einer inflammatorischen Immunantwort wirkt und diese auch an der Angiogenese und Gewebsrekonstruktion nach kutanen Verletzungen, wie sie auch bei den Scheinbehandlungen auftreten, beteiligt sind (Chen, Mo & Lau 2001). CSF-abhängig erfolgt die Transkription der „immediate early“-Gene

Jun und Fos sowie Cyclin D (Roussel 1997). Jun wirkt supprimierend auf die Zellproliferation (Passegué & Wagner 2000), ebenso unterbinden p21 und p27 ein Fortschreiten des Zellzyklus (Liu *et al.* 2006). Bei resistenten wie auch BALB/c-Mäusen herunterreguliert war der durch NF- κ B induzierte Chemokinrezeptor Cxcr4 (Helbig *et al.* 2003), der als Co-Rezeptor für die Invasion von HIV in T-Zellen fungiert und bei den verschiedensten Formen von Tumorerkrankungen heraufreguliert ist (Balkwill 2004), außerdem *in vitro* vermehrte Migration, Invasion und Überleben von Tumorzellen vermittelt (Kulbe *et al.* 2004).

Als stammesunabhängig durch die Scheinbehandlung induziert kann somit hauptsächlich eine deutliche Regulation proinflammatorischer Gene festgehalten werden, deren Produkte allgemein eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung chirurgischen Stresses spielen (Ono & Mochizuki 2000), sowie eine Beeinflussung mit der Regulation des Zellzyklus assoziierter Gene.

Deutlich gegenteilige Regulation erfuhren verschiedene Hitzeschockproteine, die bei BALB/c durch die Scheinbehandlung sehr stark herunter-, bei resistenten Tieren in gleichem Maße heraufreguliert wurden. Hitzeschockproteine erfüllen wichtige Aufgaben u. a. beim Aufbau von Proteinkomplexen, so dass einige Hitzeschockproteine auch beim Aufbau der für die Antigenerkennung verantwortlichen Immunglobuline und des T-Zell-Rezeptors ebenso wie Genprodukte des MHC beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Antigenprozessierung spielen (Zügel & Kaufmann 1999). Nur bei resistenten Tieren waren nach Scheinbehandlung Cyclin D2, Pten und Jagged 2 sowie Igh-4 und Igh-6 heraufreguliert. Der Vergleich resistenter Tiere nach Scheinbehandlung mit den entsprechenden BALB/c-Mäusen ergab 378 differenziell exprimierte Gene und dabei auch deutliche Unterschiede in der Regulation verschiedener in der Kandidatenregion lokalisierter Gene, so bei Crip1, Igh-4 und -6 sowie die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase Wars, darüber hinaus für IL-6-Rezeptor und TNFRSF6. Das inflammatorische Zytokin IL-6 wird unter anderem auf Stimulation durch Mediatoren wie IL-1 hin gebildet und wirkt wie daraufhin ebenfalls ausgeschüttete Chemokine oder CSF mit bei der B- und T-Zell-Differenzierung und -Aktivierung, der Hämatopoese und der Extravasation von Leukozyten (Mantovani, Bussolino & Dejana 1992). Somit reagieren die kongenen Stämme deutlich unterschiedlich auf einen operativen Eingriff hinsichtlich der Expression vor allem von Genen, die mit der Regulation von Apoptose bzw. Zell-Survival und des Zellzyklus sowie mit der Funktionalität von Immunzellen und verschiedenen Immunglobulinen assoziiert sind.

Nach **Mikrofilarieninjektion** waren zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen 80 Gene differenziell exprimiert, darunter IL-1 β und erneut beide S100a8 und S100a9. Die Netzwerkanalyse ergab allerdings kaum funktionale Zusammenhänge zwischen den regulierten Genen, so dass hier kein deutliches Expressionsprofil zu erkennen ist. Durch die Mikrofilarieninjektion wurde bei resistenten Tieren die Expression von nur 22 Genen beeinflusst, wohingegen bei BALB/c 204 Gene nach Mikrofilarieninjektion gegenüber Scheinbehandlung differenziell exprimiert waren. Unter den exklusiv bei BALB/c heraufregulierten Genen fanden sich eine Vielzahl immunologisch relevanter Oberflächmoleküle (CD = cluster of differentiation) sowie Cyclin D2, Pten, Akt2, zwei T-Zell-Rezeptorgene und die regulatorische Untereinheit Pik3r1 der Phosphatidylinositolkinase Pik3, die aktivierend auf den Akt-Signalweg wirkt (Kops & Burgering 1999).

Exklusiv bei resistenten waren nur sehr wenige Gene reguliert, darunter das heraufregulierte CD28, das neben seiner Bedeutung im Akt-Signalweg eine wichtige Rolle im frühen Stadium der T-Zell-Aktivierung, für das Überleben der T-Zellen und für die Ausbildung einer T_H2-Immunantwort spielt (Lenschow, Walunas & Bluestone 1996; Allegre, Frauwirth & Thompson 2001).

Die Clusteranalyse aller in zumindest einem Vergleich differenziell regulierter Gene ergab mehrere Cluster von Genen, deren Expressionsverläufe sich nach verschiedenen Behandlungen deutlich zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen unterscheiden. Hierunter fielen etliche mit Zellzyklus, Transkription und Translation assoziierte Gene sowie Hitzeschockproteine, also Gene mit großteils sehr allgemeinen regulatorischen Funktionen, jedoch beispielsweise nur wenige vor allem immunologisch bedeutsame Gene.

Somit scheinen nach diesen Ergebnissen für *mfr*-kongene Mäuse Genexpressionsunterschiede unter anderem bei Genen des Akt-Signalweges sowie weiteren Apoptose bzw. Survival vermittelnden Genen wesentlich zu sein, darüber hinaus sind auch verschiedene Regulatoren der T_H1-/T_H2-Balance betroffen, sowie mit der Differenzierung, Aktivierung und Funktionalität von T- und B-Zellen und allgemein mit der Regulation des Zellzyklus assoziierte Gene.

Stammesunabhängig führten die Eingriffe zur vermehrten Expression vieler T_H1-assoziierter Gene, wie dies durch die Operation selbst wie auch durch mögliches Einbringen von Pathogenen zu erwarten ist. Da sich resistente und suszeptible Tiere bereits zwei Stunden nach der Mikrofilarieninjektion durch in vielen Generationen signifikant niedrigere

Mikrofilariendichten gegenüber den suszeptiblen Tieren auszeichnen, sind konstitutiv schon zwischen naiven Tieren differenziell exprimierte Gene hier als Kandidaten für die Vermittlung der Resistenz besonders viel versprechend, so das bei BALB/c stärker exprimierte antiapoptotische Jagged 2, das in der Kandidatenregion liegt, sowie das bei Resistenten stärker exprimierte, proapoptotische Pten, das in unmittelbarem funktionellen Zusammenhang mit dem ebenfalls in der Kandidatenregion lokalisierten Akt steht. Interessant ist die Beobachtung, dass bei beiden kongenen Stämmen durch Scheinbehandlungen die Expression ähnlich vieler Gene reguliert wurde, auf eine Mikrofilarieninjektion hin aber bei BALB/c annähernd 10-mal so viele Gene eine veränderte Genexpression aufwiesen wie bei resistenten Tieren. Würde man davon ausgehen, dass die Resistenz eine Besonderheit des einen kongenen Stammes ist, dann läge der Schluss nahe, dass bei resistenten Mäusen für die Ausprägung des resistenten Phänotyps wesentliche Gene bereits durch einen unspezifischen Stimulus induziert oder inhibiert werden. Nun sind bei einer innaten Immunantwort differenziell exprimierte Wirtsgene nicht nur eine Folge regulatorischer Prozesse von Seiten des Wirtes als Reaktion auf Pathogene und andere Stimuli, sondern beschreiben auch die von Pathogenen angewandten Strategien, die Immunantwort des Wirtes zu umgehen (Nau *et al.* 2002). Wenn man bedenkt, dass tatsächlich nicht die Resistenz, sondern vielmehr die Suszeptibilität gegenüber Mikrofilarien von *L. sigmodontis* eine Ausnahme unter den immun-kompetenten Labormausstämmen darstellt (Hoffmann *et al.* 2000), erscheint die Annahme logischer, dass unter der Vielzahl nach Mikrofilarieninjektion differenziell exprimierter Gene solche sind, die bei BALB/c spezifisch durch Mikrofilarien reguliert werden und Suszeptibilität vermitteln. Unter diesen nur bei BALB/c durch Mikrofilarieninjektion induzierten Genen finden sich wiederum unter anderem Pten sowie Akt2 und Pik3r1, daher kann zumindest eine Beteiligung des Akt-Signalwegs an der Ausprägung von Resistenz oder Suszeptibilität vermutet werden. Allerdings sind für Akt und Pi3k bislang zwar vielfältige Rollen bei der Regulation von Angiogenese (Somanath *et al.* 2006) und der Kontrolle von Tumoren mit Ansatzmöglichkeiten für die Entwicklung von Krebsmedikamenten (Hennessy *et al.* 2005), bei der innaten Immunantwort gegen Viren (Noyce, Collins & Mossman 2006), bei bakteriellen Infektionen mit *Porphyromonas gingivalis* (Urnoway *et al.* 2006) sowie bei Infektionen mit protozoischen Parasiten wie *T. gondii* (Kim & Denkers 2006), *Trypanosoma cruzi* (Wilkowsky *et al.* 2001) und *Theileria parva* (Kuenzi, Schneider & Dobbelaere 2003; Dobbelaere & Kuenzi 2004) beschrieben, für Infektionen mit metazoischen Pathogenen in Vertebraten liegen jedoch (noch) keine Publikationen über einen Einfluss des Akt-Signalweges auf den Infektionsverlauf vor. Neben dem Akt-Signalweg scheinen darüber

hinaus Mechanismen involviert zu sein, die üblicherweise eher der adaptiven Immunantwort zugerechnet werden, auch wenn z. B. für B-Zellen wichtige Funktionen auch für die innate Immunantwort beschrieben sind (Brigandi *et al.* 1996; Rotman *et al.* 1996; Herbert *et al.* 2000).

Nach **Scheinimplantation** in das Peritoneum und einer Woche später erfolgter intravenöser Injektion von Mikrofilarien, zeigten resistente Mäuse nur für sehr wenige Gene eine differenzielle Genexpression, so für das heraufregulierte, inflammatorische Makrophagenprotein Mip2 (= Chemokinligand Cxcl1), das unter T_H1-Bedingungen nach der auf chirurgische Manipulation der Peritonealhöhle oder experimentelle abdominale Sepsis folgenden Einwanderung von CD4⁺- α - β -T-Zellen mit der Bildung von Adhäsionen assoziiert ist (Chung *et al.* 2002), bei Tumorerkrankungen Angiogenese fördert (van Damme, Struyf & Opendakker 2004) und allgemein als Chemoattraktans für Neutrophilen wirkt (Driscoll 1994). Ebenso war der Apoptose-Inhibitor Birc5 (Survivin) heraufreguliert, der bei experimentellen Arterienverletzungen vermehrt in vaskulären Zellen exprimiert wird und dadurch Apoptose und Kaspaseaktivierung inhibiert (Blanc-Brude *et al.* 2002). Bei BALB/c hingegen waren etwa 15-mal so viele Gene von einer Expressionsänderung betroffen, darunter Gene für den T-Zell-Rezeptor, das für die Signaltransduktion über den T-Zell-Rezeptor notwendige CD3 (Kappes, Alarcon & Rgueiro 1995), der B-Zell-Oberflächenmarker CD40, CD8b1, mehrere Immunglobulingene, darunter auch solche aus der Kandidatenregion (Igh-4, Igh-VJ558) und IgM, sowie der Chemokinrezeptor Ccr2, der eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung von Monozyten nach experimentellen vaskulären Verletzungen und der Entstehung von Arteriosklerose spielt (Charo & Taubman 2004), ebenso wie Cx3c1 (Bursill, Channon & Greaves 2004). Das von Thrombozyten produzierte Cxcl7 lockt Neutrophile an Entzündungsorte und reguliert deren Adhäsion (Schenk *et al.* 2002). Der Vergleich resistenter und suszeptibler Tiere nach Scheinimplantation ergab neben den beschriebenen Genen noch weitere mit einer deutlich unterschiedlichen Expression, so unter anderem für das T- und B-Zelloberflächenmolekül CD5, für Cxcl14 (BRAK), ein Chemoattraktans für dendritische Zellen (Shellenberger *et al.* 2004), das chemotaktische Monozytenprotein Ccl8 (MCP-1; van Damme, Struyf & Opendakker 2004), das in inflammatorischer Umgebung von Endothelzellen produzierte, Chemoattraktion und Adhäsion vermittelnde Cx3c11 (Imai *et al.* 2005) sowie Bcl-2-like 1, das in die Vermittlung von Apoptose involviert ist (Gulbins, Drescher & Bock 2003).

Durch Scheinimplantation wurden also deutlich unterschiedliche Muster differenzieller Genexpression bei resistenten und suszeptiblen Mäusen induziert, die praktisch keinerlei Übereinstimmung aufweisen. Bei BALB/c wurde eine Expressionsänderung vieler Gene für Chemokine sowie bereits als in Zusammenhang mit operativen Eingriffen stehend beschriebener Proteine induziert, während resistente Tiere erstaunlicherweise praktisch nicht auf den Eingriff reagierten. Möglicherweise wird bei ihnen bereits durch Mikrofilarien ein entsprechendes Expressionsprofil induziert, während Mikrofilarien in BALB/c aktiv die Induktion bzw. Inhibierung der betroffenen Gene verhindern und so ein ihr Überleben sicherndes Milieu schaffen können. Von daher sind auch die bei den Scheinimplantationen zu beobachtenden Unterschiede in der Genexpression zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen möglicherweise wesentlich für das Verständnis der innaten Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien.

Interessant sind die im Vergleich zu den Scheinimplantationen umgekehrten Verhältnisse bei den **Adultweibchenimplantationen**. Hier waren bei resistenten Tieren exklusiv etwa 10-mal so viele annotierte Gene reguliert wie bei BALB/c. Durch Implantation von Adultweibchen wird in BALB/c keine Modifikation des Phänotyps erreicht, diese bleiben weiterhin suszeptibel gegenüber injizierten Mikrofilarien. In genetisch resistenten Tieren hingegen induzieren adulte Weibchen eine Suszeptibilität gegenüber nachfolgend injizierten Mikrofilarien. Während in BALB/c also bereits eine für die Mikrofilarien positive Umgebung herrscht, bewirkt in resistenten Mäusen erst die Immunmodulation adulter Weibchen ein Überleben der Mikrofilarien (Hoffmann *et al.* 2001; Schumacher 2002). Dies lässt vermuten, dass in BALB/c keine wesentliche Beeinflussung des Genexpressionsprofils durch adulte Weibchen notwendig ist, um eine das Überleben der Mikrofilarien fördernde Umgebung zu schaffen, während bei resistenten Tieren die Notwendigkeit einer deutlichen Änderung der Genexpression Resistenz vermittelnder Gene für die Schaffung einer für die Mikrofilarien günstigen Umgebung möglich erscheint. Solche exklusiv bei resistenten Tieren durch Adultweibchenimplantation regulierten Gene waren unter anderem das heraufregulierte Cyclin D2, das hingegen exklusiv bei BALB/c bereits nach Mikrofilarieninjektion heraufreguliert war. Nur bei resistenten Mäusen durch Adultweibchen herunterreguliert war der inflammatorische Chemokinligand Cxcl1 (Gro), der nach Scheinimplantation exklusiv bei resistenten heraufreguliert war. Aus der Kandidatenregion war Igh-VJ558 zugleich mit drei Probesets herunterreguliert. Am stärksten bei resistenten Mäusen herunterreguliert war CD177, das bereits durch Mikrofilarieninjektion nur in BALB/c-Mäusen herunterreguliert

wurde. CD177 mit den Allelen NB1 und PRV-1 kodiert für das humane Neutrophilenantigen 2a und ein Protein, das bei einer bestimmten Form myeloproliferativer Erkrankungen auf Neutrophilen stark überexprimiert ist (Caruccio *et al.* 2006). Im direkten Vergleich zwischen resistenten und BALB/c-Mäusen bestanden unter anderem deutliche Unterschiede in der Expression von IL-1 β , einer Immunglobulin- λ -Kette, einem Pik3-Peptid und verschiedenen Zellzyklusregulatoren. Schwächer exprimiert bei resistenten war auch das Zinkfingerprotein Bcl11b (B-cell lymphoma/leukaemia 11b), das für die Differenzierung und das Überleben von α - β -T-Zellen essenziell ist (Wakabayashi *et al.* 2003). Aus den Ergebnissen der Adultweibchenimplantationen kann daher vermutet werden, dass auch Neutrophile und T-Zellen neben der Regulation des T_H1-/T_H2-Milieus und des Zellzyklus sowie der Akt-Pathway entweder aktiv an der Eliminierung von Mikrofilarien in Labormäusen beteiligt sind oder aber zumindest durch diese in der Expression der korrespondierenden Gene beeinflusst werden.

4.4 Beteiligung verschiedener Zelltypen an der innaten Resistenz gegen Mikrofilarien

In FACS-Analysen wurden eine Vielzahl verschiedener Zelltypen des peripheren Blutes von suszeptiblen und resistenten Mäusen vor und nach Mikrofilarieninjektion sowie nach L3-Infektion untersucht, außerdem wurde unabhängig hierzu noch die Leukozytendichte nach L3-Infektion bestimmt. Die Leukozytenzahlen resistenter und suszeptibler Mäuse stimmten dabei fast exakt überein, daher erscheint es gerechtfertigt, auch die sich aus den FACS-Analysen ergebenden relativen Anteile einzelner Leukozytenpopulationen zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen direkt gegenüberzustellen und als absolut zu betrachten.

In naivem Zustand lag der Anteil der Monozyten, damit auch der Vorläufer der Makrophagen, bei resistenten Tieren deutlich über dem bei suszeptiblen Tieren. **Makrophagen** kommt bei verschiedenen lymphatischen Filariosen eine Schlüsselrolle für den Verlauf der Infektion zu. Tote oder absterbende Filarien aktivieren Makrophagen auf dem klassischen Weg und führen hierdurch zu einem T_H1-dominierten Milieu, während vitale Würmer Produkte sekretieren, die alternative Aktivierung von Makrophagen und ein T_H2-Milieu bewirken (Allen & Loke 2001), was dann allerdings in den Bereich der adaptiven Immunantwort fällt. *In vitro* sind Makrophagen von Mongolischen Rennmäusen oder Labormäusen in der Lage, Mikrofilarien

von *A. viteae* oder *B. pahangi* abzutöten (Haque *et al.* 1980²; Karavodin & Ash 1982), wobei vor allem Sauerstoffradikale und Stickoxidverbindungen als Effektoren angenommen werden, auch wenn diese Substanzen für sich alleine eine mikrofilarizide Wirkung teilweise nur in hohen Konzentrationen bzw. nach langem Kontakt der Mikrofilarien zeigen (Thomas, McCrossan & Selkirk 1997). *In vivo* konnte bei natürlichen Infektionen mit *L. sigmodontis* in CBA/N-Mäusen, welche die *xid*-Mutation (x-linked immune deficiency, ein Defekt im *btr*-Gen für Brutons Tyrosinkinase) tragen, eine stark verminderte Eliminierung von Mikrofilarien gegenüber Wildtyptieren festgestellt werden (Al-Qaoud, Fleischer & Hoerauf 1998). Wurde dies oft hauptsächlich einem Defekt der Entwicklung und Funktion von B-Zellen, im Besonderen B1-Zellen, zugesprochen (u. a. Paciorowski *et al.* 2000), so legen andere Untersuchungen doch zumindest eine Beteiligung von Makrophagen hierbei nahe, wenn sie nicht gar als Haupteffektorzellen angesehen werden müssen (Mukhopadhyay *et al.* 1999¹, 1999²). Somit scheinen Makrophagen sowohl in der innate Immunantwort gegen isolierte Mikrofilarien wie auch bei chronischen Filariosen wichtige Aufgaben zuzukommen. In unseren Versuchen konnte nach Injektion von Mikrofilarien von *L. sigmodontis* jedoch kein Unterschied in der Resistenz von MARCO^{-/-}-Mäusen auf resistantem C57BL6-Hintergrundgenom gegenüber den Wildtyptieren festgestellt werden. MARCO^{-/-}-Mäuse weisen einen Knockout in einem zur Pathogenerkennung und auch zur Rekrutierung von Makrophagen wesentlichen Oberflächenrezeptor von Makrophagen sowie wenigen weiteren Zelltypen auf. Entsprechende Makrophagen zeigen stark verminderte phagozytotische Aktivität und Pathogenerkennung und sind damit funktionell sehr stark eingeschränkt (Yamada *et al.* 1998). Daher sind Makrophagen *in vivo* an der Eliminierung injizierter Mikrofilarien von *L. sigmodontis* durch immunkompetente Labormäuse zwar möglicherweise beteiligt, nicht jedoch essenziell bzw. ursächlich für die Resistenz.

NK-Zellen wurden bislang eher mit der innate Immunität gegen Viren, Bakterien und Protozoen in Verbindung gebracht, Korten *et al.* (2002) beschrieben jedoch eine Assoziation von NK-Zellen mit der Immunantwort von Mäusen gegen *L. sigmodontis* bei natürlichen Infektionen. Depletion von NK-Zellen führte in ihren Versuchen *in vivo* zu einer starken Zunahme der Adultwurmlast. Auch bei der Kontrolle von intestinal parasitierenden Helminthen sind NK-Zellen von Bedeutung. Während zunächst vermutet wurde, dass IL-13, dem hier eine zentrale Rolle für die Kontrolle der Infektion zukommt, von T-Zellen produziert wird, so wiesen McDermott *et al.* (2005) seine Herkunft von im intestinalen Epithel lokalisierten NK-Zellen nach. Murine Leishmaniosen mit *L. major* führen bei

Mäusestämmen mit einer frühen NK-Zell-Antwort zur raschen Ausbildung einer T_H1 -Immunantwort, wie sie auch für alleinige Mikrofilarieninfektionen typisch ist, während andere Mäusestämme ohne frühe NK-Zell-Antwort ein schützendes T_H1 -Milieu erst später aufbauen und eine progressive, fatale Infektion erleiden (Scharton-Kersten & Scott 1995). Auch die Ergebnisse der FACS-Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigen Unterschiede hinsichtlich NK-Zellen zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen. Sowohl in naivem Zustand wie auch nach Injektion von Mikrofilarien waren bei resistenten die Anteile von NK-Zellen signifikant höher, so dass eine Beteiligung von NK-Zellen an der Vermittlung der innaten Resistenz gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* möglich erscheint.

Die Zahl der im peripheren Blut befindlichen **Granulozyten** war bei naiven *mfr*-kongenen Tieren gleich. Nach Mikrofilarieninjektion nahm sie bei beiden Mäusestämmen zu, lag dann jedoch bei resistenten Tieren signifikant über dem Wert der suszeptiblen. Die besonders von neutrophilen Granulozyten gebildeten Proteine S100a8 und S100a9 wiesen bei naiven resistenten Tieren eine deutliche stärkere Genexpression auf als bei den suszeptiblen. *In vitro* umgeben Neutrophile *O. volvulus*-Mikrofilarien binnen 18 Stunden nach Kontakt völlig (Gillette-Ferguson *et al.* 2004). Ausschlaggebend scheint hier eine Stimulation durch die endosymbiontischen Wolbachien zu sein. Die Mikrofilarien von *L. sigmodontis* enthalten ebenfalls Wolbachien, so dass eine ähnliche Granulozytenaktivierung mit darauf folgender Beteiligung an der Eliminierung der Mikrofilarien auch hier denkbar ist.

Deutliche Unterschiede in den **T-Zell-Populationen** waren bereits bei naiven kongenen Tieren nachzuweisen. Bei resistenten Tieren war der Anteil von aktivierten T_H -Zellen und T_{Memory} -Zellen ($CD4^+CD44^+$) signifikant höher als bei suszeptiblen. Dementsprechend wiesen suszeptible Mäuse einen signifikant größeren Anteil naiver T_H -Zellen ($CD4^+CD44^-$) auf. Nach Mikrofilarieninjektion waren die Verhältnisse umgekehrt, hier waren die Anteile von T_H -Zellen ($CD4^+$), von Memory- und Effektor-T-Zellen ($CD4^+CD62L$ low) und von aktivierten zytotoxischen $CD8a^+$ - und $CD8b^+$ -T-Zellen nun bei suszeptiblen Tieren deutlich erhöht gegenüber den resistenten. Ebenfalls deutlich höher waren bei suszeptiblen Tieren die Werte für die Expression von CD8a, d. h. dieser Zelltyp wies bei ihnen eine deutlich stärkere Aktivierung auf als bei resistenten Mäusen. Aoki *et al.* (1998) beschreiben eine wesentliche Beteiligung vor allem von $CD4^+$ -T-Zellen an der innaten Resistenz und Pathogenese von Mäusen bei Infektionen mit Larven von *A. cantonensis*, wobei eine Behandlung mit Antikörpern gegen CD4 bei resistenten wie suszeptiblen Mäusestämmen zu höheren

Überlebensraten der Würmer und durch Suppression einer Eosinophilie zu geringerer Pathologie führte. Nach Depletion von CD4⁺-Zellen in C57BL/6-Mäusen und nachfolgender Infektion mit *A. cantonensis* beobachteten Lee *et al.* (1996) ebenfalls eine höhere Überlebensrate, die Depletion von CD8⁺-Zellen führte zu einer verstärkten Eliminierung der Würmer. Im Gegensatz zu diesen Veröffentlichungen und zu den Ergebnissen der FACS-Analysen konnten durch die Kreuzung T-Zell-defizienter Nude-Mäuse mit BALB/c.DBA/1-*mfr* allerdings Nachkommen erzielt werden, die bei phänotypisch ersichtlicher Homozygotie für das *nude*-Allel dennoch einen deutlich resistenten Phänotyp aufwiesen. Somit kann für T-Zellen zwar durchaus eine Beteiligung an der innate Immunantwort auch gegenüber Mikrofilarien von *L. sigmodontis* vermutet werden, jedoch scheinen sie für eine erfolgreiche Eliminierung der Mikrofilarien nicht essenziell zu sein.

Die Ergebnisse der Mikrofilarieninjektionsversuche an Iga^{-/-}-Mäusen und ihren Kreuzungen mit BALB/c.DBA/1-*mfr* sprechen hingegen deutlich für einen Einfluss eines homozygot vorliegenden Knockouts von Iga auf den Phänotyp genetisch resistenter Mäuse und damit für eine Beteiligung von **B-Zellen** an der Vermittlung der innate Resistenz gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis*. Die Arbeiten von Brigandi *et al.* 1996, Rotman *et al.* 1996 und Herbert *et al.* 2000 zeigten ebenfalls eine Beteiligung von B-Zellen an der Vermittlung der innate Resistenz gegen Helminthenlarven, dort gegen solche von *Strongyloides stercoralis*. In den FACS-Analysen war nach Mikrofilarieninjektion ein deutlich höherer Anteil immaturer sowie ein deutlich niedrigerer Anteil reifer B-Zellen an der gesamten B-Zell-Population bei resistenten gegenüber suszeptiblen Tieren nachweisbar, bei naiven Tieren hingegen konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die B-Zellen bei suszeptiblen Tieren in irgendeiner Form in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind, weswegen auf eine Stimulation durch Mikrofilarien hin als Kompensation eine im Vergleich zu resistenten Tieren verstärkte Reifung von B-Zellen erfolgt, die jedoch nicht zur Eliminierung der Mikrofilarien beitragen kann. Hierzu passen sehr gut die Ergebnisse der Phäno- und Genotypisierung von Nachkommen der Kreuzung von SCID-Mäusen mit BALB/c.DBA/1-*mfr*. Hier konnte gezeigt werden, dass für den *mfr* heterozygote Tiere existieren, die erwartungsgemäß einen resistenten Phänotyp zeigen sollten, sich bei wahrscheinlich homozygotem Vorliegen der *scid*-Mutation jedoch suszeptibel gegenüber Mikrofilarien von *L. sigmodontis* verhalten. SCID-Mäuse weisen T- wie B-Zell-Defekte auf, nach den Ergebnissen der Kreuzungsexperimente mit Iga^{-/-}- und Nude-Mäusen kann daraus eine essenzielle Beteiligung von B-, nicht jedoch von T-Zellen an der Vermittlung der innate

Resistenz abgeleitet werden. Neben dem direkten Ausfall von funktionellen B-Zellen und damit dem Fehlen von Antikörpern kommt bei Tieren aus der Kreuzung SCID x BALB/c.DBA/1-*mfr* noch eine Beeinflussung des Akt-Signalweges als Ursache für die Ausprägung eines suszeptiblen Phänotyps in Frage. Feng *et al.* (2004) beschrieben das bei SCID-Mäusen betroffene Gen *Prkdc* bzw. die dadurch kodierte DNA-abhängige Proteinkinase als identisch mit S473K, die durch Phosphorylierung von Akt an Ser-473 dessen Aktivierung bewirkt, so dass bei homozygotem Vorliegen der *scid*-Mutation keine Aktivierung von Akt erfolgen dürfte.

Stammesunabhängig konnte nach Mikrofilarieninjektion ein Rückgang aktivierter T_H-, T_{Memory}- und CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, Monozyten sowie eine allgemeine Lymphopenie beobachtet werden. Dagegen waren für NK-Zellen, Granulozyten sowie naive T_H- und immature B-Zellen Zunahmen festzustellen. Die Zunahmen von NK-Zellen und Granulozyten erscheinen im Zuge der Infektion sinnvoll, die Abnahme der anderen Zellpopulationen bzw. die Zunahme naiver Immunzellen erscheint weniger logisch und deutet eventuell darauf hin, dass der Vergleich der Ergebnisse der FACS-Analysen an infizierten und naiven Tieren nicht zulässig ist, da es sich hier nicht um die selben Tiere handelte. Jedoch beobachtete auch Pfaff (2001) eine Abnahme der gesamten Leukozytenpopulation im peripheren Blut nach Injektion von Mikrofilarien von *L. sigmodontis*, was auf das Festhalten der Leukozyten in Lymphknoten im Sinne einer effektiven Antigenerkennung wie bei Mackay *et al.* (1992) beschrieben zurückgeführt wird.

4.5 Die Rolle von Antikörpern bei der Eliminierung von Mikrofilarien

Verschiedene Immunglobulingene waren in unseren Genexpressionsanalysen zwischen resistenten und suszeptiblen Tieren differenziell reguliert. Darüber hinaus ist auch in der Kandidatenregion für den *mfr* eine Vielzahl entsprechender Gene lokalisiert, was eine Beteiligung von Antikörpern an der innate Resistenz gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* möglich erscheinen lässt. In Infektionsexperimenten von Gray & Lawrence (2002) hingegen mit immunkompetenten Mäusestämmen mit unterschiedlich schneller Eliminierung von *B. malayi*-Mikrofilarien, konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Antikörper-

produktion gefunden werden. Allerdings wiesen Mäuse mit genetischer Immundefizienz hinsichtlich B-Zell-Funktionalität und Antikörperproduktion signifikant erhöhte Mikrofilariämien gegenüber Tieren der jeweiligen Wildtypstämme auf, so B-Zell-defiziente μ MT(C57BL/6)- und FcR γ -defiziente (Sv129 \times C57BL/6)-Mäuse. Daraus schlossen die Autoren, dass eine durch den Fc-Rezeptor vermittelte Antikörperantwort eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Mikrofilarien spielt. So wiesen z. B. auch Individuen aus *B. malayi*-Endemiegebieten, bei denen keine Mikrofilarien nachweisbar waren, hohe Konzentrationen von Antikörpern gegen Mikrofilarienscheiden auf (McGreevy *et al.* 1980). Dies wurde auch in verschiedenen Tiermodellen *in vivo* gezeigt, so für *B. malayi* und *A. viteae* in den Mäusestämmen CBA/N und CBA/H (Thompson *et al.* 1979 & 1981). Antikörper und Komplementfaktoren sowohl aus humanen wie auch tierischen Wirten vermitteln *in vitro* die Adhäsion von Effektorzellen und damit in einigen Fällen auch das Abtöten von Mikrofilarien von *B. malayi* (Piessens & da Silva 1982) sowie *W. bancrofti* (Simonsen 1983^{1 und 2}), und Antikörper gegen Mikrofilarien-chitinase sind in Mikrofilarien-negativen, asymptomatisch mit *B. malayi* Infizierten in endemischen Gebieten zu finden (Dissanayake *et al.* 1995). Eine passive Immunisierung gegen *B. pahangi* gelang Medeiros, Baldwin & Denham (1996) in Hauskatzen. Sie übertrugen Serum wiederholt infizierter und zwischenzeitlich mikrofilariennegativer Katzen auf mikrofilarienpositive. Die Übertragung von mehr als 1 μ l Serum je 1000 Mikrofilarien führte zu starkem Rückgang der Mikrofilariämie innerhalb von Minuten, Mikrofilarien waren erst 21 bis 44 Tage später wieder nachweisbar, in mehreren Fällen gar nicht mehr. Durch Transfer einzelner Immunglobulin-Isotypen konnte nachgewiesen werden, dass IgG für die Eliminierung der Mikrofilarien verantwortlich und IgG1 hierbei der aktivste Isotyp war. Das Abtöten und der Abbau der Mikrofilarien erfolgten in einer antikörperabhängigen zellvermittelten Reaktion unter Beteiligung von Eosinophilen, Neutrophilen und mononukleären Zellen (engl. ADCC = antibody-dependent cellular cytotoxicity).

Diese Versuche zeigen eine prinzipielle Beteiligung von Antikörpern an der Elimination von Mikrofilarien verschiedener Filarienarten. Dies betrifft in den zitierten Arbeiten allerdings nur die adaptive Immunantwort. In der vorliegenden Arbeit hingegen zeigten sich Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen bereits zwei Stunden nach der Injektion von Mikrofilarien, völlige Elimination konnte bei resistenten Tieren bereits nach einem Tag beobachtet werden. Somit kämen als ursächlich für die innate Resistenz gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* nur natürliche Antikörper in Frage, die bereits vor Erstkontakt mit den

Parasiten vorhanden sind. Solche Antikörper sind z. B. die Antikörper gegen fremde Blutgruppen-Antigene, die auf Kreuzreaktionen gegen Glykoproteine von Darmbakterien zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu B-Zellen des B2-Typs sind B1-Zellen unabhängig von T-Zellen, Antigenstimulierung oder Immunisierung zur Produktion von Antikörpern der IgM-Klasse befähigt, was ihnen allgemein eine wichtige Rolle in der innate Immunantwort zukommen lässt (Fagarasan & Honjo 2000). Für Antikörper als Resistenz vermittelnde Agenzien in den vorliegenden Untersuchungen sprechen die deutlichen Unterschiede zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen in den B-Zell-Populationen. Außerdem konnten auch Unterschiede in den Antikörperkonzentrationen gefunden werden, allerdings nur bei naiven Tieren, wo die Konzentrationen von unspezifischem IgG1, IgG2b und IgG3 bei resistenten Tieren signifikant über denen suszeptibler Tiere lagen. Dies ist insofern interessant, als zum einen keine Unterschiede hinsichtlich der hauptsächlich für natürliche Antikörper beschriebenen Klasse IgM zu beobachten waren, wo Antikörper vom Typ IgA oder IgG eine untergeordnete Rolle spielen (Avrameas 1991; Herzenberg & Kantor 1993), und zum anderen mit IgG2b und IgG3 T_H1 - wie auch zugleich mit IgG1 T_H2 -spezifische Antikörperklassen (Estes & Brown 2002) bei resistenten Tieren stärker vertreten waren. Somit kann nicht pauschal davon ausgegangen werden, dass resistente Tiere beispielsweise schneller und ausgeprägter als suszeptible Mäuse eine T_H1 -Immunantwort etablieren, wie sie speziell bei Anwesenheit von Mikrofilarien zu beobachten ist und z. B. protektiv in putativ Immunen in Bezug auf Infektionen mit *W. bancrofti* ist (Pearlman *et al.* 1993; Dimock, Eberhard & Lammie 1996; Mahanty *et al.* 1996). Die relative Abnahme der verschiedenen IgG-Subklassen bei resistenten Tieren schon drei Stunden nach Mikrofilarieninjektion könnte mit der Bindung solcher Antikörper an die Mikrofilarien erklärt werden, wodurch weniger freie Antikörper nachweisbar wären. Der aus den Beobachtungen an SCID-Mäusen, aus den FACS-Analysen sowie aus den in der Kandidatenregion lokalisierten Genen resultierenden Annahme, dass (natürliche) Antikörper ursächlich für die innate Resistenz von Labormäusen gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* sein könnten, widersprechen jedoch die Versuche zur Plasma- und Blutübertragung und zur Ammenaufzucht. Die Übertragung von Plasma und Blut naiver resistenter auf suszeptible Mäuse führte zu keiner rascheren Eliminierung injizierter Mikrofilarien, selbst die Übertragung von Blut bereits acht Tage zuvor mit Mikrofilarien infizierter resistenter Tiere auf suszeptible hatte keinen Einfluss auf deren Phänotyp, obwohl nach dieser Zeit neben unspezifischen auch spezifische Antikörper vorhanden sein müssten. In Mongolischen Rennmäusen sind bei Infektionen mit *A. viteae*

nach einer Woche spezifische Antikörper vom Typ IgG nachweisbar (Abraham, Weiner & Farrell 1986), IgM tritt noch wesentlich früher auf.

Die Aufnahme von Kolostralmilch ist für viele Säugetierarten durch die Übertragung verschiedener maternalen Immunglobuline auf die Nachkommen von wesentlicher Bedeutung für das Immunsystem der Neugeborenen. Dabei hält z. B. bei Kälbern die protektive Wirkung der Kolostrumversorgung mit etwa 6 Monaten wesentlich länger an als es die Halbwertszeiten der verschiedenen Immunglobulin-Isotypen erwarten ließen (Kaske, Kehler & Schubert 2003). Hierfür wird als Ursache eine Idiotypvakzinierung angenommen, wie sie Magliani *et al.* (1998) beschrieben. Gegen in diesem Fall auf neugeborene Mäuse *via* Milch übertragene maternale Antikörper gegen ein Kapselpolysaccharid von Streptokokken werden α -Idiotyp-Antikörper gebildet, gegen welche wiederum in einem adaptiven Prozess α - α -Idiotyp-Antikörper produziert werden, die dann dieselbe Epitopspezifität wie die ursprünglichen maternalen Immunglobuline aufweisen. Dies stellt somit eine Verbindung zwischen passiver und aktiver Immunisierung dar, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit denkbar wäre. Es konnte hier jedoch kein Effekt der Aufnahme von Milch naiver resistenter Mütter durch suszeptible Jungtiere auf deren Phänotyp bei einer 13 bzw. 19 Tage später erfolgten Mikrofilarieninjektion beobachtet werden.

Dies spricht daher nicht für eine Beteiligung von Antikörpern oder anderen *via* Blut oder Milch übertragbaren humoralen Mediatoren an der Vermittlung der innaten Resistenz von Labormäusen gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis*, was jedoch in Widerspruch zu den nachgewiesenen Unterschieden in den Antikörperkonzentrationen bereits bei naiven kongenen Tieren sowie den Ergebnissen der Kreuzungsversuche von SCID- und $Ig\alpha^{-/-}$ -Mäusen mit BALB/c.DBA/1-*mfr* steht, die zumindest auf eine wesentliche Rolle von B-Zellen schließen lassen. Daher sind hierzu sicher weitere Untersuchungen und evtl. auch die Übertragung noch größerer Blut- oder Serummengen notwendig. Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Ergebnissen konnten allerdings auch Folkard, Jenkins & Bianco (1996) feststellen, dass ein protektiver Effekt, der in Mäusen nach Sensibilisierung durch Infektion mit lebenden Mikrofilarien von *O. lienalis* induziert wird, nur durch Zell-, nicht jedoch durch Serumtransfer auf naive Tiere übertragbar ist. Hingegen vermittelte ein Serumtransfer von mit abgetöteten Mikrofilarien vakzinierten Mäusen auf naive Tiere zu 54 % einen Schutz vor lebenden Mikrofilarien. Die Autoren schließen daraus, dass Vakzinierung und Infektion in der

Labormaus verschiedene gegen Mikrofilarien von *O. lienalis* protektive Mechanismen aktivieren.

Unabhängig von einer eventuellen Bedeutung von Antikörpern für die innate Resistenz konnte bei beiden Mäusestämmen eine deutliche Zunahme der Konzentrationen von IgG3, dessen Nachweis als T_H1-typisches Immunglobulin bei einer Infektion mit Mikrofilarien zu erwarten war, und vor allem von IgM beobachtet werden, das die allgemein bei Infektionen zuerst auftretende Immunglobulinklasse darstellt.

4.6 Vakzinierungsexperimente mit Mikrofilarien

Neben der Betrachtung der bei der innaten Immunantwort nach Mikrofilarieninjektion stattfindenden Prozesse und Unterschiede, auf die hin die kongenen Mäuse gezüchtet wurden, war auch die Untersuchung möglicher *mfr*-abhängiger Unterschiede der kongenen Tiere hinsichtlich der adaptiven Immunantwort von Interesse. Aus früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit Mikrofilarien von *L. sigmodontis* in Labormäusen (Pfaff 2001) sowie z. B. aus den Untersuchungen von Tamashiro *et al.* (1989) mit Mikrofilarien von *Dirofilaria immitis* in Lewis-Ratten war bekannt, dass die Injektion lebender oder toter Mikrofilarien protektiv auf eine in ausreichendem zeitlichem Abstand erfolgende Zweitinjektion lebender Mikrofilarien wirkt, d. h. die Zirkulationsdauer der Mikrofilarien ist deutlich verkürzt, jedoch nicht mit der bei definitionsgemäß resistenten Tieren vergleichbar. Eigene Experimente (Schumacher 2002) zeigten, dass suszeptible Mäuse 30 Tage nach einer Injektion von Mikrofilarien von *L. sigmodontis* signifikant höhere Konzentrationen der verschiedenen Immunglobulinklassen aufweisen als resistente Tiere, was auf eine stärkere Stimulation des Immunsystems durch die bei suszeptiblen Tieren länger im peripheren Blut zirkulierenden Mikrofilarien zurückzuführen sein dürfte. In der vorliegenden Arbeit konnte dementsprechend gezeigt werden, dass in suszeptiblen Tieren der Verlauf einer Zweitinfektion mit Mikrofilarien 39 Tage nach einer Erstinfektion signifikant beschleunigt ist. Interessant ist, dass der Verlauf einer Zweitinfektion nur drei oder sieben Tage nach einer Erstinfektion gegenüber dieser bei suszeptiblen Tieren unverändert war bzw. die Mikrofilariendichten aufgrund der noch zirkulierenden Mikrofilarien des vorangegangenen Experiments teilweise signifikant über den entsprechenden Werten der Erstinfektion lagen, hingegen bei resistenten Tieren eine extreme Beschleunigung des Mikrofilarienabbaus zu beobachten war, so dass bereits einen Tag nach der Zweitinfektion keine Mikrofilarien mehr nachweisbar waren. D. h.

bei resistenten Tieren muss eine sehr starke Stimulation der innaten Immunantwort zuzuschreibender Mechanismen erfolgt sein, was bei einer Zweitinfektion zur annähernd sofortigen Eliminierung aller Mikrofilarien führte, wie dies bei einer antikörpervermittelten sekundären Immunantwort so drastisch nicht zu beobachten ist, so dass hier vermutlich nicht von einer wirklichen Vakzinierung gesprochen werden kann.

4.7 Rolle der Lunge beim Mikrofilarienabbau

Um zu untersuchen, ob Resistenz und Suszeptibilität kongener Mäuse gegen injizierte Mikrofilarien statt immunologischen vielmehr physiologische Ursachen zugrunde liegen, etwa unterschiedliche Durchmesser der Lungenkapillaren und damit möglicherweise grundlegend unterschiedliches, unspezifisches Filterverhalten der Lungen, wurden Microbeads intravenös injiziert und die Gesamtzahl von der Lunge zurückgehaltener Beads bestimmt. Hierbei zeigten *mfr*-kongene Tiere fast exakt übereinstimmende Werte. Somit ist es zumindest sehr unwahrscheinlich, dass eine unterschiedliche Clearance der Mikrofilarien durch die Lunge aufgrund unspezifischer physiologischer Unterschiede ursächlich für die Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber Mikrofilarien ist.

Die Lunge bzw. das Lungenkapillarsystem als Hauptabbauort der Mikrofilarien, wie bei Pfaff (1997) für Mäuse der Stämme BALB/c und C57BL/6 beschrieben, konnte durch intrapleurale Mikrofilarieninjektionen bei kongenen Tieren jedoch auch hier bestätigt werden. Bei suszeptiblen Tieren benötigten die injizierten Mikrofilarien einen Tage, bis sie bei einzelnen Tieren in geringer Zahl im peripheren Blut nachweisbar waren, es erfolgte dann jedoch bei allen Tieren ein deutlicher Anstieg der Mikrofilariendichten bis Tag 5, die anschließend auf diesem Niveau verblieben. Hingegen fanden sich nur bei einem einzigen resistenten Tier sehr wenige Mikrofilarien ein und zwei Tage nach der Injektion, an Tag 3 war auch dieses Tier mikrofilarienneutral. Dies spricht dafür, dass die Mikrofilarieninjektion in direkter Nähe des Hauptabbauortes erfolgt war, so dass bei innat resistenten Tieren in der Lunge oder den Lungenkapillaren die immunvermittelte Elimination der Mikrofilarien sofort einsetzte, während in suszeptiblen Tieren bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Mikrofilarien aus der Lunge in die Peripherie gelangen konnten, kein wesentlicher Mikrofilarienabbau stattgefunden hatte.

Ebenfalls bestätigt werden konnten die Beobachtungen von Pfaff (2001) bei *L. sigmodontis* und Pacheco (1974) bei *D. immitis*, nach denen unabhängig von der Gesamtzahl injizierter

Mikrofilarien immer nur ein relativ konstanter Anteil im peripheren Blut zirkuliert. In der hier vorgestellten Arbeit lagen die entsprechenden Werte resistenter Tiere für alle Injektionsdosen unter denen der suszeptiblen Tiere, so dass die innate Resistenz gegen Mikrofilarien von *L. sigmodontis* durch einen dynamischen Prozess mit einem Gleichgewicht zwischen zirkulierenden und abgefangenen (oder aktiv in der Lunge verbleibenden) Mikrofilarien gekennzeichnet ist, und damit die Pleura als Mikrofilarienreservoir nicht – wie zunächst vermutet – eine maximale Anzahl an Mikrofilarien aufnehmen kann, nach deren Erreichen alle weiteren Mikrofilarien in die Peripherie gelangen.

4.8 Infektion *mfr*-kongener Mäuse mit anderen Stadien von *L. sigmodontis*

Wenngleich der hier vorgestellte Mäusestamm BALB/c.DBA/1-*mfr* nur auf innate Resistenz gegen intravenös injizierte Mikrofilarien hin gezüchtet wurde, so ist doch die Frage, ob diese resistenten Mäuse gegenüber suszeptiblen Tieren nicht auch unterschiedliches Verhalten bei Infektionen mit anderen Parasitenstadien, insbesondere bei natürlichen Infektionen mit L3, zeigen, für die allgemeine Bedeutung dieses Tiermodells wesentlich.

Verschiedene Mäusestämme wie C57BL/6 und DBA/1 verhalten sich bei Injektion von **L3** von *L. sigmodontis* resistent, bei ihnen erfolgt keine Weiterentwicklung der Larven. In „semi-immunen“ Stämmen wie CBA und C3H entwickeln sich die Parasiten bis zum Adultstadium, ohne dass die Wirtstiere jedoch patent werden. Lediglich in Stämmen wie BALB/c und anderen mit sehr ähnlichem genetischem Hintergrund findet eine volle Entwicklung bis hin zur Produktion von Mikrofilarien statt (Hoffmann *et al.* 2001, nach Petit *et al.* 1992 und Maréchal *et al.* 1996). Babayan *et al.* (2003) beschreiben allerdings für die Weiterentwicklung der L3 in semi-resistenten und suszeptiblen Mäusen zunächst lediglich ein unterschiedliches Längenwachstum. 10 und 30 Tage nach der Injektion von 40 L3 waren die inzwischen zu L4 bzw. Adulten herangewachsenen Würmer beiderlei Geschlechts in C57BL/6-Mäusen signifikant kürzer als in BALB/c-Mäusen. Signifikante Unterschiede in den Rückfindungsraten bestanden zwischen den beiden Mäusestämmen nicht, lediglich eine Tendenz zu einer etwas niedrigeren Rate in den semi-resistenten Mäusen wurde beobachtet. Da in der vorliegenden Untersuchung eine Infektion der Versuchstiere mit L3 durch den Biss infizierter Milben erfolgte, ist die Zahl der jeweils übertragenen L3 unbekannt, so dass auch keine Rückfindungsraten ermittelt werden können. Jedoch stimmten die absoluten Zahlen bei

der Obduktion gefundener Adultwürmer im arithmetischen Mittel fast exakt zwischen den kongenen Mäusestämmen überein. Hingegen konnten wie auch von Babayan *et al.* beschrieben signifikant geringere Körperlängen männlicher wie weiblicher Adultwürmer bei BALB/c.DBA/1-*mfr* gegenüber BALB/c beobachtet werden. Aus früheren eigenen Versuchen (Schumacher 2002) war bereits bekannt, dass in den zu BALB/c kongenen, innat resistenten Mäusen eine Entwicklung von *L. sigmodontis* bis zum Adultstadium erfolgt, es jedoch praktisch nicht zur Patenz kommt. Lediglich bei einem einzigen resistenten Tier konnte damals eine einzelne Mikrofilarie in einer Blutprobe gefunden werden, während bei 30 % der BALB/c-Mäuse zirkulierende Mikrofilarien nachgewiesen werden konnten. Sowohl in diesen Versuchen wie auch in der hier vorgestellten Experimenten traten einzelne BALB/c.DBA/1-*mfr* mit okkulten Mikrofilarien auf, d. h. die Mikrofilarien gelangten nicht in die Zirkulation des peripheren Blutes, waren aber in anderen Körperkompartimenten nachweisbar, wie dies von Hoffmann, Schulz-Key & Wenk (1992) für Baumwollratten beschrieben wurde. In der vorliegenden Arbeit war allerdings der Anteil patent infizierter BALB/c-Mäuse erheblich geringer als erwartet. Ursache könnte hier aufgrund der unbekanntenen Anzahl übertragener L3 sowohl eine zu geringe wie auch eine zu hohe Infektionsdosis sein. Babayan *et al.* (2005) beschreiben für die Injektion mit 200 L3 in BALB/c-Mäuse ein deutlich selteneres Auftreten patentierender Wirtstiere gegenüber Infektionen mit 25 L3, sowie geringere Körperlängen, herabgesetzte Mikrofilarienproduktion und Defekte der männlichen Kopulationsorgane, was sie auf unterschiedlich ausgeprägte immunologische Vorgänge seitens des Wirtes in der frühesten Phase der Infektion zurückführen. In der vorliegenden Arbeit traten allerdings noch erheblich seltener patente Tiere auf als bei den Versuchen von Babayan *et al.* mit hohen Infektionsdosen, außerdem berichten Taubert & Zahner (2001) für 100 % aller Infektionen mit 160 L3 von Patenzentwicklung. Aus den aktuellen wie auch früheren eigenen Versuchen geht für Mäuse des Stammes BALB/c.DBA/1-*mfr* ein abweichender Verlauf einer L3-Infektion gegenüber BALB/c hervor. Aufgrund der definitionsgemäßen genetischen Übereinstimmung beider Stämme außer im *mfr* kann für diesen vermutet werden, dass er neben der innaten Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien zumindest auch eine Semi-Resistenz gegenüber L3 von *L. sigmodontis* vermittelt.

Haisch (1996) konnte bei Mäusestämmen mit unterschiedlicher Immunkompetenz (IL-4^{-/-}-Mäusen auf genetischem BALB/c-Hintergrund und Tieren des Wildtyps) im Blut Unterschiede in der Leukozyten- und Eosinophilendichte nach L3-Infektion nachweisen, die assoziiert waren mit deutlichen Unterschieden in der Mikrofilariämie und der Wurmlast. In

unseren *mfr*-kongenen Mäusen stimmten die Werte für Leukozyten und Eosinophile exakt überein, für die unterschiedliche Entwicklung der L3 in den beiden Mäusestämmen scheinen Leukozyten und Eosinophile demnach nicht verantwortlich zu sein. Auch die FACS-Analysen ergaben keine Unterschiede für verschiedene Zellpopulationen zwischen resistenten und suszeptiblen Mäusen, allerdings zeigten T_H- und B-Zellen sowie allgemein Leukozyten bei BALB/c durch höhere Fluoreszenzintensitäten stärkere Aktivierung an. Eventuell lässt dies auf eine stärkere zelluläre Immunantwort suszeptibler Tiere als Reaktion auf sich in ihnen besser als in resistenten Mäusen entwickelnden *L. sigmodontis* schließen, die jedoch nicht zu einer effektiven Abwehr führt. Stammesunabhängig führt eine Infektion mit L3 im Vergleich zu naiven Tieren zu einer Zunahme der Populationen von T_H-, T_{Memory}-, NK-Zellen wie auch Granulozyten sowie zu einer Abnahme von CD8⁺-, B-Zellen und Monozyten. Während Rajan, Ramalingam & Rajan (2005) in Experimenten mit IgM-defizienten Mäusen und der Übertragung von Seren infizierter auf naive Tiere klar die Bedeutung von IgM für die Eliminierung von L3 von *B. pahangi* feststellen konnten, zeigten resistente wie suszeptible Tiere hier keine Unterschiede hinsichtlich der Immunglobulinkonzentrationen, vielmehr war stammesunabhängig eine hoch signifikante Zunahme der Konzentrationen von IgG1, IgG2b, IgG3 und IgM zu beobachten, so dass entweder davon ausgegangen werden muss, dass diese Antikörperklassen nicht essenziell für die Eliminierung der L3 sind, oder aber dass BALB/c und BALB/c.DBA/1-*mfr* Unterschiede in deren Funktionalität aufweisen. Die hier vorgestellten Ergebnisse betreffen nicht-parasitenspezifische, polyklonale Antikörper, so dass Unterschiede bezüglich parasitenspezifischer Immunglobuline weiterhin denkbar und noch zu untersuchen sind. Einen Hinweis auf Unterschiede in der Antikörperproduktion zwischen den kongenen Mäusen gibt die Beobachtung, dass bei resistenten Mäusen nach L3-Infektion deutlich häufiger Rheumafaktoren nachweisbar waren als bei suszeptiblen. Rheumafaktoren sind von B-Zellen u. a. nach der Erkennung von PAMP über TLR produzierte Autoantikörper, die neben ihrer Bedeutung für die rheumatoide Arthritis auch allgemein eine Bedeutung sowohl für die innate wie für die adaptive Immunantwort haben (Nowak & Newkirk 2005). Adebajo *et al.* (1992) konnten für *Loa loa*-Infektionen des Menschen mit oder ohne begleitende Glomerulonephritis eine Zunahme sowohl für IgG- als auch für IgM-Rheumafaktor nachweisen, für die Nierenpathologie aufgrund einer Infektion mit *B. malayi* scheinen IgG-Rheumafaktoren keine Rolle zu spielen (Langhammer, Birk & Zahner).

Auf eine Injektion von Mikrofilarien in nach L3-Infektion nicht patent gewordene kongene Tiere zu einem Zeitpunkt, zu dem die L3 inzwischen zu Adultwürmern herangewachsen

waren, folgte bei BALB/c-Mäusen ein Mikrofilariämieverlauf, wie er auch bei alleiniger Mikrofilarieninjektion zu beobachten ist. Bei den resistenten Tieren traten sowohl solche auf, bei denen eine extrem beschleunigte Eliminierung der Mikrofilarien aus dem peripheren Blut zu beobachten war, wie auch eines, das einen ebenso suszeptiblen Phänotyp wie BALB/c zeigte. Dass die Anwesenheit lebender wie abgetöteter **adulter Männchen** von *L. sigmodontis* vermutlich durch starke antigene Stimulation bei gegen Mikrofilarien resistenten Mäusen verschiedener Stämme zu einer Verstärkung der Resistenz und damit einem beschleunigten Mikrofilarienabbau führt, ist aus früheren Versuchen bekannt und konnte auch durch Implantationsversuche in dieser Arbeit bestätigt werden, während **adulte Weibchen** durch aktive Modulation der Wirtsimmunantwort in genetisch resistenten Tieren einen suszeptiblen Phänotyp induzieren (Hoffmann *et al.* 2001; Schumacher 2002). Auch konnte bei Onchozerkose-Patienten festgestellt werden, dass ihre zelluläre Reaktivität durch E/S-Produkte von Adultweibchen, nicht jedoch von Adultmännchen von *O. volvulus* gehemmt wurde (Elkhalifa *et al.* 1991). Die hier beobachteten unterschiedlichen Infektionsverläufe können damit erklärt werden, dass es aufgrund der teilweise sehr geringen Anzahl adulter Würmer, wie sie in den obduzierten Tieren desselben Versuchs teilweise festgestellt wurde, zu einer unterschiedlichen Geschlechterverteilung der Adultwürmer in den genetisch resistenten Mäusen kam. Bei einem Geschlechterverhältnis zugleich implantierter Männchen und Weibchen von 5:2 überwiegt der immunsuppressive Effekt der Weibchen, was zu einer Verzögerung des Abbaus injizierter Mikrofilarien in genetisch resistenten Mäusen führt, während ein Geschlechterverhältnis von 5:1 durch Überwiegen des immunstimulatorischen Effekts der Männchen zu einem stark beschleunigten Mikrofilarienabbau führt (Hoffmann, persönliche Mitteilung).

Die Implantation von **L4** in BALB/c.DBA/1-*mfr* führte bei einer vier Tage später erfolgten Mikrofilarieninjektion zu einer starken Beschleunigung des Mikrofilarienabbaus, bereits zwei Stunden nach der Injektion waren nur bei einem von sechs Tieren überhaupt Mikrofilarien im peripheren Blut nachweisbar. Dies spricht dafür, dass L4-Antigene unabhängig vom Geschlecht der Larven eine ebenso starke stimulatorische Wirkung auf das Immunsystem genetisch resistenter Mäuse hervorrufen wie adulte Männchen. Eine zweite Mikrofilarieninjektion in dieselben Tiere zu einem Zeitpunkt, an dem die L4 inzwischen zu adulten Würmern herangewachsen waren, im Falle der Weibchen jedoch noch ohne Mikrofilarien freizusetzen, führte bei fünf von sechs Tieren zur Ausbildung eines suszeptiblen Phänotyps, nur eines erwies sich weiterhin als resistent, was wie oben beschrieben eventuell auf ein entsprechendes Geschlechterverhältnis der adulten Würmer zurückgeführt werden

kann. Das bedeutet, dass erst nach der letzten Häutung, wenn junge adulte Würmer vorliegen, eine Modulation der Immunantwort gegen Mikrofilarien nachgewiesen werden kann, wie sie auch durch Implantation prämaturer Adultweibchen gezeigt wurde (Hoffmann *et al.* 2001).

4.9 Mikrofilarieninjektionen in immundefiziente Mäusestämme auf resistantem genetischem Hintergrund

Wie aktuell von Babu *et al.* (2006) beschrieben, führen patente Infektionen des Menschen mit *B. malayi* zu einer Abschwächung nicht nur der T_H1-Antwort, wie dies früher angenommen wurde, auch die Produktion von T_H2-Zytokinen ist deutlich herabgesetzt. Dennoch sind damit auch weiterhin Zytokine wie TNF- α und INF- γ betroffen, deren Produktion insbesondere bei alleinigen experimentellen Infektionen mit Mikrofilarien induziert wird (Pfaff *et al.* 2000). Mikrofilarien von *B. malayi* induzieren Apoptose in humanen dendritischen Zellen und inhibieren unter anderem deren IL-10-Produktion (Semnani *et al.* 2003). Andererseits weisen patent mit *L. loa* und *W. bancrofti* Infizierte eine deutlich stärkere IL-10-Expression im Vergleich zu Kontrollen auf (Winkler *et al.* 1999; Ravichandran *et al.* 1997), so dass auch diesem immunsuppressiven (Ndiaye, Dhivert-Donnadieu & Demoly 2003) T_H2-Zytokin eine Rolle in der Immunantwort bei Filariosen zukommt. Transplantationsversuche mit *L. sigmodontis* in IL-10^{-/-}-Mäusen auf resistantem genetischem Hintergrund führten zu einem deutlich beschleunigten Mikrofilarienabbau, so dass eine wesentliche Bedeutung von IL-10 für die Persistenz von Mikrofilarien angenommen wurde (Hoffmann *et al.* 2001). Bei alleiniger Mikrofilarieninjektion in C57BL/6- sowie IL-10^{-/-}-Mäusen auf demselben genetischen Hintergrund zeigen jedoch beide Stämme einen gleichermaßen resistenten Phänotyp, so dass diese Feststellung zumindest nicht für den Verlauf einer reinen Mikrofilarieninfektion gilt, wie auch Hoffmann *et al.* feststellten. Bei INF- γ R^{-/-}- und TNFRp55^{-/-}-Mäusen gleichfalls auf C57BL/6-Hintergrund konnten jedoch ebenfalls keine Unterschiede in der Eliminationsgeschwindigkeit gegenüber den Wildtypmäusen festgestellt werden, so dass auch diese T_H1-Zytokine zumindest nicht alleine oder hauptsächlich verantwortlich sind für die Vermittlung der innate Immunantwort gegen Mikrofilarien. Die Untersuchungen von Schmidt-Oehm (2006) zeigen anhand von Kreuzungen von BALB/c.DBA/1-*mfr* mit C.12952-*Stat4^{tm1Gru}*, dass auch ein Knockout des Gens für Stat4, das

eine zentrale Rolle in der Ausbildung einer T_H1 -Immunantwort einnimmt (Murphy *et al.* 1999), keinen Einfluss auf die innate Resistenz hat. Somit scheint eine T_H1 -Immunantwort nicht direkt ursächlich für die Eliminierung der Mikrofilarien zu sein.

4.10 Ausblick

Die von uns angewandte serielle Rückkreuzungsstrategie – die derzeit bereits bis zur Generation N20 geführt hat – ermöglicht in Kombination mit der hier ebenfalls etablierten Genotypisierung des Resistenzlocus mittels co-segregierender Mikrosatelliten eine Vielzahl weiterer Ansätze. So kann mit einem erweiterten Markersset die Kandidatenregion weiter eingeeengt werden. Die daraus resultierenden Kandidatengene werden durch positionelles Klonieren und Sequenzieren weiter auf Unterschiede zwischen den kongenen Tieren untersucht. Funktionelle Untersuchungen sollen dann die tatsächliche Bedeutung dieser Gene für die Vermittlung der innate Resistenz klären.

Wie auch schon früher im Falle des Resistenzgens *Nramp* wurde hier gezeigt, dass mit dieser Strategie, die etwas abseits der klassischen immunologischen Methodik liegt, wichtige genetische Determinanten der innate Immunantwort entschlüsselt werden können. Die enormen Fortschritte in der Mausgenetik und -genomik sowie die ebenfalls rasch voranschreitende Bioinformatik ermöglichen es zukünftig, ähnliche Fragestellungen zur Resistenz und Empfänglichkeit in Parasit-Wirt-Beziehungen bedeutend schneller als bisher zu bearbeiten. Bis ca. Ende 2007 werden die wichtigsten 15 Mausinzuchtstämme komplett sequenziert sein. Dazu gehören auch sog. Haplotyp-Karten, die Vergleiche von SNPs zwischen verschiedenen Mausstämmen ermöglichen. Die Herausforderungen, die sich aus solchen komplexen Fragestellungen ergeben, werden dann weniger von Seiten der Genetik und Genomik gestellt. Vielmehr ist es die Parasitologie oder allgemein die Infektionsbiologie, die nun geeignete Modellsysteme bereitstellen muss, die einen schnellen und einfachen „Readout“ ermöglichen. Außerdem gibt es mittlerweile das Verfahren der „Speed congenics“, bei dem durch Rückkreuzungen und markergestützte Selektionsprotokolle kongene Stämme in nur einem Drittel der bisher benötigten Zeit gezüchtet werden können (Wong 2002).

Die an der innate Immunantwort beteiligten Mechanismen sind bislang nur für Pathogene wie Viren, Bakterien und protozoische Parasiten gut untersucht und teilweise aufgeklärt. In die Abwehr solcher Pathogene sind fast immer phagozytotische Prozesse und intrazelluläre

Lyse involviert. Über die Mechanismen der Eliminierung von größeren Pathogenen wie Mikrofilarien oder anderen Helminthenlarven, die schon aufgrund ihrer Größe nicht von Phagozyten aufgenommen werden können, gibt es dagegen kaum Informationen.

In Infektionsexperimenten mit anderen Pathogenen soll geklärt werden, ob der *mfr* auch eine Bedeutung für deren Eliminierung hat. Erste Ergebnisse mit *S. mansoni* (Hüpkes 2005) und *P. berghei* ANKA (Bucher, persönliche Mitteilung) liegen bereits vor. Zusätzliche Infektionsexperimente mit anderen Filarien in unseren *mfr*-kongenen Mäusen könnten darüber Auskunft geben, ob die endosymbiontischen Wolbachien für die innate Immunantwort gegen Mikrofilarien bedeutsam sind. Vorläufige Ergebnisse aus Experimenten mit *A. viteae* und *B. malayi* liegen ebenfalls bereits vor (Hoffmann, persönliche Mitteilung). Mikrofilarien von *B. malayi* wurden in BALB/c.DBA/1-*mfr* ebenso schnell abgebaut wie die von *L. sigmodontis*, während *A. viteae* in beiden kongenen Stämmen persistierte. Letztere besitzt keine Wolbachien und keine zusätzliche Eihülle (Mikrofilarienscheide), während *B. malayi* wie *L. sigmodontis* gescheidete Mikrofilarien mit Wolbachien aufweist. Beide Merkmale könnten für die unterschiedliche Reaktivität der *mfr*-kongenen Mausstämme verantwortlich sein. Deshalb wären zusätzliche Versuche mit Mikrofilarien von *L. loa* aufschlussreich, da diese gescheidete Mikrofilarien ohne Wolbachien besitzt.

Ob sich die im Modell *L. sigmodontis* in der Labormaus relevanten Kandidatengene für die Mikrofilariämieresistenz letztlich auf natürliche Filariosen des Menschen übertragen lassen, bleibt offen. Sicherlich lässt sich das aus methodischen Gründen zunächst so gewählte Infektionsmodell der intravenösen Injektion von Mikrofilarien nicht direkt mit den natürlichen Verhältnisse bei Filariosen vergleichen. Allerdings zeigt die phänotypische Divergenz *mfr*-kongener Mäuse nach experimenteller Infektion mit dritten Larven einen möglichen Einfluss des *mfr* auch auf natürliche Infektionen.

Sobald ein oder mehrere Mikrofilariämieresistenzgene gefunden und charakterisiert worden sind, sollte man nach orthologen Genen beim Menschen aus Filarioseendemiegebieten suchen. Dann kommt es darauf an – unter sinnvollem Einsatz des enormen Potenziales der Humangenom-Datenbanken – gut charakterisierte Gruppen von Individuen mit unterschiedlichen parasitologischen, klinischen und immunologischen Phänotypen genotypisch miteinander zu vergleichen. Möglicherweise ließen sich dann aus der Identifizierung genetischer Determinanten der Abwehr von Helminthenlarven auch neue Strategien zur Bekämpfung dieser Parasitosen ableiten.

5 Zusammenfassung

Filarien sind in Wirbeltieren parasitierende Nematoden mit in der Regel ausgeprägter Wirtsspezifität. Sie modulieren das Immunsystem ihrer Wirte und entgehen dadurch der Immunabwehr, was den chronischen Verlauf von Filariosen erklärt. Dies gelingt jedoch nur in geeigneten, suszeptiblen Wirten. Andere, auch nahe verwandte Arten sind als Wirte oft ungeeignet, und selbst innerhalb von Wirtspopulationen der gleichen Art sind unterschiedliche Krankheitsverläufe zu beobachten. Genetische Unterschiede zwischen den Wirtsindividuen scheinen dabei eine wichtige Rolle zu spielen.

Filariosemodelle in Kleinsäugetieren ermöglichen durch kontrollierte Umweltbedingungen im Labor – im Gegensatz zu Felduntersuchungen – den Ausschluss störender Umwelteinflüsse und erlauben es, auf die genetischen Determinanten für Resistenz und Suszeptibilität zu fokussieren. Dafür stellt die Nagerfilariose *Litomosoides sigmodontis* in der Labormaus ein geeignetes und etabliertes Modell dar. Verschiedene Inzuchtstämme reagieren unterschiedlich auf injizierte Mikrofilarien von *L. sigmodontis*. Nach Injektion in DBA/1-Mäuse beispielsweise werden die Mikrofilarien innerhalb der ersten ein bis zwei Tage eliminiert, während sie bei BALB/c-Mäusen teilweise länger als einen Monat im Blut zirkulieren. Mausstämme, die innerhalb von vier Tagen Mikrofilarien vollständig eliminieren können, wurden von uns als resistent, solche mit längerer Mikrofilariämie als suszeptibel definiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Kreuzung von BALB/c und DBA/1 und anschließende serielle Rückkreuzung mit BALB/c ein zu letzteren kongener Mäusestamm etabliert (BALB/c.DBA/1-*mfr*), der sich nur in der Resistenz gegen injizierte Mikrofilarien von BALB/c unterscheidet, im Hintergrundgenom mit diesen jedoch identisch ist. Aufgrund der Spaltungsverhältnisse der Phänotypen der Nachkommen aus diesen Kreuzungen konnte ein monogener, autosomaler und dominanter Erbgang für die beobachtete Mikrofilariämie-resistenz angenommen werden. Durch genomweite Mikrosatellitenanalysen wurde auf Chromosom 12 in einer Region zwischen 56 und 61 cM distal des Centromers ein Mikrofilariämie-Resistenzlocus, von uns *mfr* genannt, lokalisiert. Neben diesem Haupt-resistenzlocus werden 2 weitere Loci auf den Chromosomen 3 und 9 angenommen, die modulierend auf die Ausprägung der Resistenz wirken. Essenziell für einen grundsätzlich resistenten Phänotyp ist demnach nur der *mfr*, DBA/1-Allele an den weiteren Loci beschleunigen möglicherweise den Mikrofilarienabbau zusätzlich.

Durch Hauttransplantationen zwischen *mfr*-kongenen Tieren wurde eine Übereinstimmung im Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) nachgewiesen, d. h. MHC-abhängige Mechanismen scheiden als Ursache der Mikrofilariämieresistenz aus.

Die Kandidatenregion für den *mfr* umfasst derzeit unter anderem Gene, die mit dem TNF-Signalweg assoziiert sind und solche, die allgemein auf die Ausbildung von T_H1- und T_H2-Immunantworten einwirken, sowie die Gensegmente, die für die variablen Regionen der schweren Immunglobulinketten kodieren. Ein weiterer Kandidat in dieser Region ist auch das Akt1-Gen, welches für die Proteinkinase B kodiert und Signalwege beeinflusst, die mit Apoptose bzw. Zell-Survival assoziiert sind.

Mit Tieren der Stämme BALB/c.DBA/1-*mfr* und BALB/c wurden Genexpressionsanalysen im naiven Zustand oder nach verschiedenen Infektionsmodi durchgeführt. Hier zeigten naive Tiere bereits wenige, aber klar definierte Unterschiede in der Expression bestimmter Gene, unter anderem solcher, die in der Kandidatenregion lokalisiert sind oder mit solchen assoziiert sind. Scheinbehandlungen durch Injektion von Zellkulturmedium führten zur Expression vieler proinflammatorischer und an der Regulation des Zellzyklus beteiligter Gene. Verschiedene immunologisch bedeutsame Gene, darunter einige der in der Kandidatenregion lokalisierten Immunglobulin-Gensegmente und Gene, die an der Regulation apoptotischer Prozesse beteiligt sind, waren zwischen *mfr*-kongenen Mäusen differenziell reguliert. Mikrofilarieninjektionen führten bei suszeptiblen BALB/c-Mäusen zur Regulation von zehnmal so vielen Genen wie bei resistenten Tieren. Darunter waren verschiedene am Akt-Signalweg beteiligte Gene.

Möglicherweise führen also nicht etwa nur bei resistenten Tieren existierende spezifische Mechanismen zur Mikrofilarieneliminierung, sondern vielmehr erfolgt umgekehrt in suszeptiblen Tieren durch die Mikrofilarien eine Modulation der Genexpression und der Immunantwort, die ein für ihr Überleben günstiges Milieu schafft. Dafür spricht auch die Tatsache, dass durch Implantation adulter Filarienweibchen, die den Abbau nachfolgend injizierter Mikrofilarien in resistenten Tieren deutlich verzögert, rund 10-mal mehr Gene differenziell exprimiert wurden als bei BALB/c-Mäusen. Filarienweibchen scheinen durch aktive Einflussnahme auf die Genexpression resistenter Mäuse eine das Überleben der Mikrofilarien begünstigende Umgebung zu erzeugen, während BALB/c eine solche auch ohne modulatorische Einflüsse adulter Weibchen bereits bieten.

Eine direkte Beteiligung von Makrophagen und T-Zellen an der innate Resistenz konnte nicht nachgewiesen werden, wohingegen Granulozyten und NK-Zellen eher darin involviert sind. Durch Kreuzung von B-Zell-defizienten $I\gamma\alpha^{-/-}$ bzw. B- und T-Zell-defizienten SCID-Mäusen mit BALB/c.DBA/1-*mfr* konnte eine essenzielle Funktion von B-Zellen für die innate Resistenz gezeigt werden, wobei unklar bleibt, ob diese über Antikörper oder über den Akt-Signalweg vermittelt wird. Jedenfalls war der resistente Phänotyp nach Kreuzung von Mäusen mit der *scid*-Mutation, von der eine Auswirkung auf den Akt-Signalweg bereits bekannt ist, verändert.

Da bei resistenten Mäusen die Mikrofilariendichten bereits zwei Stunden nach Injektion signifikant unter denen suszeptibler Tiere lagen, kämen als Ursache hierfür nur natürliche Antikörper in Frage. So wiesen genotypisch resistente Tiere bereits vor Infektion bei verschiedenen Isotypen signifikant höhere Konzentrationen auf als BALB/c. Eine Übertragung solcher humoral vermittelter Resistenzfaktoren *via* Blut, Serum oder Milch führte jedoch in genotypisch suszeptiblen Mäusen nicht zu einer Änderung des Phänotyps.

Anatomische oder unspezifische physiologische Unterschiede, etwa der Lungenanatomie oder -physiologie, zwischen *mfr*-kongenen Tiere konnten sehr wahrscheinlich als Ursache für die extrem verschiedenen Phänotypen ausgeschlossen werden.

Natürliche Infektionen mit dritten Larven zeigten, dass der *mfr* nicht nur die Resistenz gegenüber einer durch Mikrofilarieninjektion erzeugten Parasitämie vermittelt, sondern sich auch auf die Empfänglichkeit bei einer natürlichen Infektion auswirkt.

6 Literaturverzeichnis

Abraham, D., Weiner, D. J. & Farrell, J. P. (1986): Cellular and humoral immune responses of birds resistant to *Dipetalonema viteae* infection. *Infection and Immunity* **52(3)**: 742-747

Adarichev, V. A., Vermes, A., Hanyecz, A., Mikecz, K., Bremer, E. G. & Glant, T. T. (2004): Gene expression profiling in murine autoimmune arthritis during the initiation and progression of joint inflammation. *Arthritis Research and Therapy* **7**: 196-207

Adebajo, A. O., Akinsola, A., Maizels, R. M., Cawston, T. E. & Hazleman, B. L. (1992): Rheumatoid factor and rheumatoid factor isotypes in loiasis with and without accompanying glomerulonephritis. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* **86(6)**: 667-669

Allen, J. E., Lawrence, R. A. & Maizels, R. M. (1996): APC for mice harbouring the filarial nematode, *Brugia malayi*, prevent cellular proliferation but not cytokine production. *International Immunology* **8**: 143-151

Allen, J. E. & Loke, P. (2001): Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunology* **23**: 345-352

Al-Qaoud, K. M., Fleischer, B., Hoerauf, A. (1998): The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis - association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. *International Immunology* **10(1)**: 17-25

Amsen, D., Blander, J. M., Lee, G. R., Tanigaki, K., Honjo, T. & Flavell, R. A. (2004): Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* **117(4)**: 515-526

Aoki, M., Sugaya, H., Ishida, K. & Yoshimura, K. (1998): The role of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells in host morbidity and innate resistance to *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasitology Research* **84(2)**: 91-99

Araujo, A. C., Souto-Padron, T. & de Souza, W. (1993): Cytochemical localization of carbohydrate residues in microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **41(4)**: 571-578

Attout, T., Babayan, S., Hoerauf, A., Taylor, D. W., Kozek, W. J., Martin, C. & Bain, O. (2005): Blood-feeding in the young adult filarial worms *Litomosoides sigmodontis*. *Parasitology* **130(4)**: 421-428. Erratum in: *Parasitology* **131(1)**: 141

Avrameas, S. (1991): Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunology Today* **12(5)**: 154-159

Babayan, S., Ungeheuer, M. N., Martin, C., Attout, T., Belnoue, E., Snounou, G., Renia, L., Korenaga, M. & Bain, O. (2003): Resistance and susceptibility to filarial infection with *Litomosoides sigmodontis* are associated with early differences in parasite development and in localized immune reactions. *Infection and Immunity* **71(12)**: 6820-6829

Babayan, S., Attout, T., Specht, S., Hoerauf, A., Snounou, G., Renia, L., Korenaga, M., Bain, O. & Martin, C. (2005): Increased early local immune responses and altered worm development in high-dose infections of mice susceptible to the filaria *Litomosoides sigmodontis*. *Medical Microbiology and Immunology* **194(3)**: 151-162

Babu, S., Blauvelt, C. P., Kumaraswami, V. & Nutman, T. B. (2006): Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. *The Journal of Immunology* **176(5)**: 3248-3256

Babu, S. & Nutman, T. B. (2003): Proinflammatory cytokines dominate the early immune response to filarial parasites. *The Journal of Immunology* **171(12)**: 6723-6732

Balkwill, F. (2004): The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Seminars in Cancer Biology* **14(3)**: 171-179

Banyer, J. L., Hamilton, N. H., Ramshaw, I. A. & Ramsay A. J. (2000): Cytokines in innate and adaptive immunity. *Reviews in Immunogenetics* **2(3)**: 359-373

Bartlett, M. S. & Haldane, J. B. S. (1935): The theory of inbreeding with forced heterozygosity. *Journal of Genetics* **31**: 327-340

Batra, S., Chatterjee, R. K. & Srivastava, V. M. (1990): Antioxidant enzymes in *Acanthocheilonema viteae* and effect of antifilarial agents. *Biochemical Pharmacology* **40**: 2363-2369

Bechtold, O. (1999): Vakzinierung von BALB/c-Mäusen mit rekombinantem Tropomyosin von *Litomosoides sigmodontis* (Filarioidea, Nematoda) und Immunogenität sequenzabgeleiteter synthetischer Peptide mit putativer MHC Klasse II-Bindungsaffinität. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Beebe, A. M., Mauze, S., Schork, N. J. & Coffman, R. L. (1997): Serial Backcross Mapping of *L. major* Resistance Loci associated with Resistance to *Leishmania major* in Mice. *Immunity* **6(5)**: 551-557

Belle, M. A. (2004): Zuchtdaten zu Körpergewicht, Fruchtbarkeit und Aufzuchtleistung der Schleißheimer Mäusestämme zwischen 1990 und 2001. Dissertation der tierärztlichen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bereth, A. (2000): Modulation der Immunantwort gegen Mikrofilarien von *Litomosoides sigmodontis* durch Implantation von adulten Würmern in verschiedene Stämme von Labormäusen. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Beutler, B., Crozat, K., Koziol, J. A. & Georgel, P. (2005): Genetic dissection of innate immunity to infection: the mouse cytomegalovirus model. *Current Opinion in Immunology* **17(1)**: 36-43

Beutler, L. (2000)¹: Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Current Opinion in Microbiology* **3**: 23-28

Beutler, L. (2000)²: Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 20-26

Blackwell, J. M. (2001): Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends in Molecular Medicine* **11**: 521-526

Blanc-Brude, O. P., Yu, J., Simosa, H., Conte, M. S., Sessa, W. C. & Altieri, D. C. (2002): Inhibitor of apoptosis protein survivin regulates vascular injury. *Nature Medicine* **8(9)**: 987-994

Bohn, E., Schmitt, E., Bielfeldt, C., Noll, A., Schulte, R. & Autenrieth, I. B. (1998): Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infection and Immunity* **66(5)**: 2213-2220

Bonhomme, F. & Guénet, J.-L. (1989): The wild house mouse and its relatives. In: Lyon, M. F. & Searle, A. G. [Hrsg.]: Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse, Oxford University Press, Oxford: 649-666

Bosma, G. C., Custer R. P. & Bosma M. J. (1983): A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* **301**: 527-530

Bosma, M. J. & Carroll, A. M. (1991): The SCID mouse mutant: Definition, characterization, and potential uses. *Annual Review of Immunology* **9**: 323-350

Bosma M. J. (1992): B and T cell leakiness in the scid mouse mutant. *Immunodeficiency Reviews* **3(4)**: 261-276

Brattig, N. W., Rathjens, U., Ernst, M., Geisinger, F., Renz, A. & Tischendorf, F. W. (2000): Lipopolysaccharide-like molecules derived from *Wolbachia* endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and anti-inflammatory responses of human monocytes. *Microbes and Infection* **2**: 1147-1157

Brattig, N. W., Bazzocchi, C., Kirschning, C. J., Reiling, N., Buttner, D. W., Cecilian, F., Geisinger, F., Hochrein, H., Ernst, M., Wagner, H., Bandi, C. & Hoerauf, A. (2004): The major surface protein of *Wolbachia* endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *The Journal of Immunology* **173(1)**: 437-445

Brattig, N. W. (2004): Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of *Onchocerca filariae* and *Wolbachia* endobacteria. *Microbes and Infection* **6(1)**: 113-128

Brigandi, R. A., Rotman, H. L., Yutanawiboonchai, W., Leon, O., Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. (1996): *Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice. *Experimental Parasitology* **82(3)**: 279-89

Brownstein, D. G., Bhatt, P. N., Gras, L. & Budris, T. (1992): Serial backcrossing analysis of genetic resistance to mousepox, using marker loci for Rmp-2 and RMP-3. *The Journal of Immunology* **148**: 1182-1187

Budd, R. C., Yeh, W. C. & Tschopp, J. (2006): cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature Reviews. Immunology* **6(3)**: 196-204

Bursill, C. A., Channon, K. M. & Greaves, D. R. (2004): The role of chemokines in atherosclerosis: recent evidence from experimental models and population genetics. *Current Opinion in Lipidology* **15(2)**: 145-149

Cardoni, R. L., Antunez, M. I., Morales, C. & Natnes, I. R. (1997): Release of reactive oxygen species by phagocytic cells in response to live parasites in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **56**: 329-334

Caruccio, L., Bettinotti, M., Director-Myska, A. E., Arthur, D. C. & Stroncek, D. (2006): The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31. *Transfusion* **46(3)**: 441-447

Chandrashekar, R., Rao, U. R., Rajasekariah, G. R. & Subrahmanyam, D. (1984): Separation of viable microfilariae free of blood cells on percoll gradients. *Journal of Helminthology* **58**: 69-70

Charo, I. F. & Taubman, M. B. (2004): Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation Research* **95(9)**: 858-866

-
- Chen, C. C., Mo, F. E. & Lau, L. F. (2001):** The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **276(50)**: 47329-47337
- Chung, D. R., Chitnis, T., Panzo, R. J., Kasper, D. L., Sayegh, M. H. & Tzianabos, A. O. (2002):** CD4⁺ T cells regulate surgical and postinfectious adhesion formation. *The Journal of Experimental Medicine* **195(11)**: 1471-1478
- Cox, R. & Mirkin, S. M. (1997):** Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. *Proclamations of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94(10)**: 5237-5242
- Colley, D. G. & Freeman G. L. (1980):** Differences in adult *Schistosoma mansoni* worm burden requirements for the establishment of resistance to reinfection in inbred mice. I. CBA/J and C57BL/6J. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **29**: 1279-1285
- Committee on standardized genetic nomenclature for mice (1989):** Rules and guidelines for gene nomenclature. In Lyon, M. F. & Searle, A. G. [Hrsg.]: *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Oxford University Press, Oxford: 1-12
- Dawkins, H. J. S., Grove, D. I., Dunsmore, J. D. & Mitchell, G. F. (1980):** *Strongyloides ratti*: susceptibility to infection and resistance to reinfection in inbred strains of mice assessed by excretion of larvae. *International Journal of Parasitology* **10**: 125-129
- Deelder, A. M., Class, F. H. S. & De Vries, R. R. P. (1978):** Influence of the mouse H-2 complex on experimental infections with *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **72**: 321-322
- Del Prete G., Maggi, E. & Romagnani, S. (1994):** Human Th1 and Th2 cells: functional properties, mechanisms of regulation, and role in disease. *Laboratory Investigation* **70(3)**: 299-306

Denis, M., Forget, A., Pelletier, M., Turcotte, R. & Skamene, E. (1986): Control of the *Bcg* gene of early resistance to infections with BCG substrains and atypical mycobacteria. *Clinical and Experimental Immunology* **63**: 517-525

Dib, C., Faure, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J. & Weissenbach, J. (1996): A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380(6570)**: 152-154

Dimock, K. A., Eberhard, M. L. & Lammie, P. J. (1996): Th1-like antifilarial immune responses predominate in antigen-negative persons. *Infection and Immunity* **64(8)**: 2962-2967

Dissanayake, S., Perler, F. B., Xu, M., Southworth, M. W., Yee, C. K., Wang, S., Dreyer, G., Watawana, L., Kurniawan, L., Fuhrman, J. A. et al. (1995): Differential recognition of microfilarial chitinase, a transmission-blocking vaccine candidate antigen, by sera from patients with Brugian and Bancroftian filariasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53(3)**: 289-294

Dobbelaere, D. A. & Kuenzi, P. (2004): The strategies of the *Theileria* parasite: a new twist in host-pathogen interactions. *Current Opinion in Immunology* **16(4)**: 524-530

Downward, J. (1998): Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology* **10(2)**: 262-267

Dragoi, A. M., Fu, X., Ivanov, S., Zhang, P., Sheng, L., Wu, D., Li, G. C. & Chu, W. M. (2005): DNA-PKcs, but not TLR9, is required for activation of Akt by CpG-DNA. *The EMBO Journal* **24(4)**: 779-789

Driscoll, K. E. (1994): Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Experimental Lung Research* **20(6)**: 473-490

Edwards, J. H. (1987): The locus ordering problem. *Annals of Human Genetics* **51(3)**: 251-258

Elkhalifa, M. Y., Ghalib, H. W., Dafa'Alla, T. & Williams, J. F. (1991): Suppression of human lymphocyte responses to specific and non-specific stimuli in human onchocerciasis. *Clinical and Experimental Immunology* **86(3)**: 433-439

Else, K. J. & Grecis, R. K. (1991): Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology* **72(4)**: 508-513

Estes, D. M. & Brown, W. C. (2002): Type 1 and type 2 responses in regulation of Ig isotype expression in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **90(1-2)**: 1-10

Fagarasan, S. & Honjo, T. (2000): T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. *Science* **290(5489)**: 89-92

Fanning, M. M. & Kazura J. W. (1983): Genetic association of murine susceptibility to *Brugia malayi* microfilaraemia. *Parasite Immunology* **5**: 305-316

Fearon, D. T. & Locksley, R. M. (1996): The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* **272**: 50-53

Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. & Hemmings, B. A. (2004): Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **279(39)**: 41189-41196

Fisher, R. A. (1965): The Theory of Inbreeding, second edition. Oliver and Boyd, Edinburgh.

Flanagan, S. P. (1966): 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetic Research* **8**: 295-309

Flint, J., Hill, A. V. S., Bowden, D. K., Oppenheimer, S. J., Sill, P. R., Serjeantson, S. W., Bana-Koiri, J., Bhatia, K., Alpers, M. P., Boyce, A. J., Weatherall, D. J. & Clegg, J. B. (1986): High frequency of α -thalassaemia are the result of natural selection by malaria. *Nature* **321**: 744-750

Folkard, S. G., Jenkins, R. E. & Bianco, A. E. (1996): Vaccination generates serum-mediated protection against *Onchocerca lienalis* microfilariae in the mouse. *Tropical Medicine & International Health* **1(3)**: 359-362

Fowlkes, B. J. & Robey, E. A. (2002): A reassessment of the effect of activated Notch1 on CD4 and CD8 T cell development. *Journal of Immunology* **169(4)**: 1817-1821

Fox, E. G. & Schacher, J. F. (1977): A comparison of syngenic laboratory rat strains as hosts of *Brugia pahangi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **70(5-6)**: 523

Frick, W., Bauer, A., Bauer, J., Wied, S. & Muller, G. (1998): Insulin-mimetic signalling of synthetic phosphoinositolyglycans in isolated rat adipocytes. *The Biochemistry Journal* **336**:163-181

Gailus-Durner, V., Fuchs, H., Becker, L. et al. (2005): Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nature Methods* **2**: 403-404

Ganz, T. (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**: 710-720

Garside, P., Sands, W. A., Kusel, J. R. & Hagan, P. (1996): Is the induction of apoptosis the mechanism of the protective effects of TNF alpha in helminth infection? *Parasite Immunology* **18(3)**: 111-113

Gillan, V. & Devaney, E. (2005): Regulatory T cells modulate Th2 responses induced by *Brugia pahangi* third-stage larvae. *Infection and Immunity* **73(7)**: 4034-4042

Gillette-Ferguson, I., Hise, A. G., McGarry, H. F., Turner, J., Esposito, A., Sun, Y., Diaconu, E., Taylor, M. J. & Pearlman, E. (2004): *Wolbachia*-induced neutrophil activation in a mouse model of ocular onchocerciasis (river blindness). *Infection and Immunity* **72(10)**: 5687-5692

-
- Goldmann, O., Lengeling, A., Böse, J., Bloecker, H., Geffers, R., Chhatwal, G. S. & Medina, E. (2005):** The role of the MHC on resistance to group A streptococci in mice. *The Journal of Immunology* **175(6)**: 3862-3872
- Gray, C. A. & Lawrence, R. A. (2002):** A role for antibody and Fc receptor in the clearance of *Brugia malayi* microfilariae. *European Journal of Immunology* **32(4)**: 1114-1120
- Green, E. L. (1981):** Genetics and Probability in Animal Breeding Experiments. Oxford University Press, New York.
- Greve, B., Lehman, L. G., Lell, B., Luckner, D., Schmidt-Ott, R. & Kremsner, P. G. (1999):** High oxygen radical production is associated with fast parasite clearance in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Journal of Infectious Diseases* **179**: 1584-1586
- Grolleau, A., Misek, D. E., Kuick, R., Hanash, S. & Mule, J. J. (2003):** Inducible expression of macrophage receptor Marco by dendritic cells following phagocytic uptake of dead cells uncovered by oligonucleotide arrays. *The Journal of Immunology* **171(6)**: 2879-2888
- Gros, P., Skamene, E. & Forget, A. (1981):** Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *The Journal of Immunology* **127**: 2417-2421
- Gudi, R., Barkinge, J., Hawkins, S., Chu, F., Manicassamy, S., Sun, Z., Duke-Cohan, J. S. & Prasad, K. V. (2006):** Siva-1 negatively regulates NF-kappaB activity: effect on T-cell receptor-mediated activation-induced cell death (AICD). *Oncogene* PMID: 16491128
- Gulbins, E., Dreschers, S. & Bock, J. (2003):** Role of mitochondria in apoptosis. *Experimental Physiology* **88(1)**: 85-90
- Haisch, K. (1996):** Die Bedeutung von Interleukin-4 für den Verlauf einer Infektion mit *Litomosoides sigmodontis* (Nematoda: Filarioidea) in Labormäusen. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Hallquist, N. A., Khoo, C. & Cousins, R. J. (1996): Lipopolysaccharide regulates cysteine-rich intestinal protein, a zinc-finger protein, in immune cells and plasma. *Journal of Leukocyte Biology* **59(2)**: 172-177

Haque, A., Worms, M. J., Oglivie, B. M. & Capron, A. (1980)¹: *Dipetalonema viteae*: Microfilariae production in various mouse strains and in nude mice. *Experimental Parasitology* **49(3)**: 398-404

Haque, A., Joseph, M., Ouaisi, M. A., Capron, M. & Capron, A. (1980)²: IgE antibody-mediated cytotoxicity of rat macrophages against microfilaria of *Dipetalonema viteae* in vitro. *Clinical and Experimental Immunology* **40(3)**: 487-495.

Heinecke, H. (1989): Angewandte Versuchstierkunde. Urban & Fischer Verlag, Jena.

Helbig, G., Christopherson, K. W. 2nd, Bhat-Nakshatri, P., Kumar, S., Kishimoto, H., Miller, K. D., Broxmeyer, H. E. & Nakshatri, H. (2003): NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of Biological Chemistry* **278(24)**: 21631-21638

Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. (2005): Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery* **4(12)**: 988-1004

Herbert, D. R., Lee, J. J., Lee, N. A., Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. (2000): Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *The Journal of Immunology* **165(8)**: 4544-4551

Herbert, D. R., Nolan, T. J., Schad, G. A., & Abraham, D. (2002): The role of B cells in immunity against larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Parasite Immunology* **24(2)**: 95-101

Herzenberg, L. A. & Kantor, A. B. (1993): B-cell lineages exist in the mouse. *Immunology Today* **14(2)**: 79-83; discussion 88-90

-
- Hill, A. V., Flint, J., Weatherall, D. J. & Clegg, J. B. (1987):** α -thalassaemia and the malaria hypothesis. *Acta Haematologica* **78**: 173-179
- Hoerauf, A. & Fleischer, B. (1997):** Immune responses to filarial infection in laboratory mice. *Medical Microbiology and Immunology* **185(4)**: 207-215
- Hoerauf, A., Satoguina, J., Saefel, M. & Specht, S. (2005):** Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunology* **27(10-11)**: 417-429
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. & Ezekowitz, R. A. (1999):** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318
- Hoffmann, W. H., Schulz-Key, H. & Wenk, P. (1992):** Occult filariasis in the cotton rat. *Tropical Medicine and Parasitology* **43**: 209-210
- Hoffmann, W. H., Petit, G., Schulz-Key, H., Taylor, D. W., Bain, O. & Le Goff, L. (2000):** *Litomosoides sigmodontis* in mice: Reappraisal of an Old Model for Filarial Research. *Parasitology Today* **16**: 387-389
- Hoffmann, W. H., Pfaff, A. W., Schulz-Key, H. & Soboslay, P. T. (2001):** Determinants for resistance and susceptibility to microfilaraemia in *Litomosoides sigmodontis* filariasis. *Parasitology* **122**: 641-650
- Hoffmann, W. H., Schulz-Key, H. & Wenk, P. (1992):** Occult filariasis in the cotton rat. *Tropical Medicine and Parasitology* **43**: 209-210
- Hokke, C. H. & Yazdanbakhsh, M. (2005):** Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunology* **27(7-8)**: 257-264
- Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M. & Aguet, M. (1993):** Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259(5102)**: 1742-1745

Hüpkes, M. (2005): Parasitologische, immunologische und molekularbiologische Untersuchungen zum Verlauf einer Infektion mit *Schistosoma mansoni* (Plathelminthes, Trematoda) in Mäusen mit unterschiedlicher angeborener Immunität gegen Mikrofilarien von *Litomosoides sigmodontis* (Filarioidea, Nematoda). Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Imai, T., Nishimura, M., Nanki, T. & Umehara, H. (2005): Fractalkine and inflammatory diseases. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **28(3)**: 131-139

Ishih, A., Ohno, T., Nishimura, M. & Terada, M. (2000): Genetic analysis of mortality in murine angiostrongyliasis costaricensis using SMXA recombinant inbred mouse strains. *Parasitology International* **49(4)**: 335-338

Jehn, B. M., Bielke, W., Pear, W. S. & Osborne, B. A. (1999): Cutting edge: protective effects of notch-1 on TCR-induced apoptosis. *Journal of Immunology* **162(2)**: 635-638

Jones, R. G., Elford, A. R., Parsons, M. J., Wu, L., Krawczyk, C. M., Yeh, W. C., Hakem, R., Rottapel, R., Woodgett, J. R. & Ohashi, P. S. (2002): CD28-dependent activation of protein kinase B/Akt blocks Fas-mediated apoptosis by preventing death-inducing signaling complex assembly. *The Journal of Experimental Medicine* **196(3)**: 335-348

Kale, O. O. (1998): Onchocerciasis: the burden of disease. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **92(1)**: 101-115

Kappes, D. J., Alarcon, B. & Regueiro, J. R. (1995): T lymphocyte receptor deficiencies. *Current Opinion in Immunology* **7(4)**: 441-447

Karavodin, L. M. & Ash, L. R. (1982): Inhibition of adherence and cytotoxicity by circulating immune complexes formed in experimental filariasis. *Parasite Immunology* **4(1)**: 1-12

Kaske, M., Kehler, W. & Schuberth, H.-J. (2003): Kolostrumversorgung bei Kälbern. *Nutztierpraxis Aktuell* **4**

-
- Kershaw, W. E. (1949):** Observations on *Litomosoides carinii* (Travassos, 1919) Chandler, 1931.-II.-The migration of the first-stage larva. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **43**: 96-115
- Kim, L. & Denkers, E. Y. (2006):** *Toxoplasma gondii* triggers Gi-dependent PI 3-kinase signaling required for inhibition of host cell apoptosis. *Journal of Cell Sciences* **119(10)**: 2119-2126
- Klein, J. & Horejsi, V. (1997):** Immunology, 2nd edition. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Klein, S. L. (2004):** Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* **26(6-7)**: 247-264
- Kops, G. J. & Burgering, B. M. (1999):** Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling. *Journal of Molecular Medicine* **77(9)**: 656-665
- Korten, S., Volkman, L., Saefel, M., Fischer, K., Taniguchi, M., Fleischer, B. & Hoerauf, A. (2002):** 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. *The Journal of Immunology* **168(10)**: 5199-5206
- Kraal, G., van der Laan, L. J., Elomaa, O. & Tryggvason, K. (2000):** The macrophage receptor MARCO. *Microbes and Infection* **2(3)**: 313-316
- Kuenzi, P., Schneider, P. & Dobbelaere, D. A. (2003):** *Theileria parva*-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis. *The Journal of Immunology* **171(3)**: 1224-1231
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. (1993):** Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75(2)**: 263-274
- Kulbe, H., Levinson, N. R., Balkwill, F. & Wilson, J. L. (2003):** The chemokine network in cancer - much more than directing cell movement. *The International Journal of Developmental Biology* **48(5-6)**: 489-496

Lai, L., Alaverdi, N., Maltais, L. & Morse, H. C. 3rd (1998): Mouse cell surface antigens: Nomenclature and immunophenotyping. *The Journal of Immunology* **160**: 3861-3868

Langhammer, J., Birk, H. W. & Zahner, H. (1997): Renal disease in lymphatic filariasis: evidence for tubular and glomerular disorders at various stages of the infection. *Tropical Medicine and International Health* **2(9)**: 875-884

Lanningham-Foster, L., Green, C. L., Langkamp-Henken, B., Davis, B. A., Nguyen, K. T., Bender, B. S. & Cousins, R. J. (2002): Overexpression of CRIP in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* **282(6)**: E1197-E1203

Lawrence, R. A. (1996): Lymphatic filariasis: What mice can tell us. *Parasitology Today* **12**: 267-271

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

Lee, J. D., Wang, J. J., Chang, J. H., Chung, L. Y., Chen, E. R., Yen, C. M. (1996): Role of T cell subpopulations in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Journal of Helminthology* **70(3)**: 211-214

Lehar, S. M. & Bevan, M. J. (2004): Immunology: polarizing a T-cell response. *Nature* **430(6996)**: 150-151

Le Goff, L., Loke, P., Ali, H. F., Taylor, D. W. & Allen, J. E. (2000): Interleukin-5 is essential for vaccine-mediated immunity but not innate resistance to a filarial parasite. *Infection and Immunology* **68(5)**: 2513-2517

Levings, M. K., Sangregorio, R. & Roncarolo, M.-G. (2001): Human CD25⁺CD4⁺ T regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *The Journal of Experimental Medicine* **193(11)**: 1295-1302

Liew, F. Y., Xu, D. & Chan, W. L. (1999): Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunology Letters* **65**: 101-104

Liu, T. Z., Chen, C. Y., Yiin, S. J., Chen, C. H., Cheng, J. T., Shih, M. K., Wang, Y. S. & Chern, C. L. (2006): Molecular mechanism of cell cycle blockage of hepatoma SK-Hep-1 cells by Epimedin C through suppression of mitogen-activated protein kinase activation and increased expression of CDK inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1). *Food and Chemical Toxicology* **44(2)**: 227-235

Mackay, C. R., Marston, W. & Dudler, L. (1992): Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *European Journal of Immunology* **22(9)**: 2205-2210

Maehama, T. & Dixon, J. E. (1998): The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of Biological Chemistry* **273(22)**: 13375-13378

Magliani, W., Polonelli, L., Conti, S., Salati, A., Rocca, P. F., Cusumano, V., Mancuso, G. & Teti, G. (1998): Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nature Medicine* **4(6)**: 705-709

Mahanty, S., Luke, H. E., Kumaraswami, V., Narayanan, P. R., Vijayshekar, V. & Nutman, T. B. (1996): Stage-specific induction of cytokines regulates the immune response in lymphatic filariasis. *Experimental Parasitology* **84(2)**: 282-290

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

Maloy, K. J. & Powrie, F. (2001): Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology* **2(9)**: 816-822

Manly, K. F., Cudmore, R. H. Jr. & Meer, J. M. (2001): Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* **12**: 939-932

Mantovani, A., Bussolino, F. & Dejana, E. (1992): Cytokine regulation of endothelial cell function. *The FASEB Journal* **6(8)**: 2591-2599

Marechal, P., Le Goff, L., Petit, G., Diagne, M., Taylor, D. W. & Bain, O. (1996): The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice. *Parasite* **3(1)**: 25-31

Markel, P., Shu, P., Ebeling, C., Carlson, G. A., Nagle, D., Smutko, J. S. & Moore, K. J. (1997): Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics* **17**: 280-284

Martin, C., Saeftel, M., Vuong, P. N., Babayan, S., Fischer, K., Bain, O. & Hoerauf, A. (2001): B-cell deficiency suppresses vaccine-induced protection against murine filariasis but does not increase the recovery rate for primary infection. *Infection and Immunity* **69(11)**: 7067-7073

McDermott, J. R., Humphreys, N. E., Forman, S. P., Donaldson, D. D. & Grencis, R. K. (2005): Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *The Journal of Immunology* **175(5)**: 3207-3213

McGreevy, P. B., Ratiwayanto, S., Tuti, S., McGreevy, M. M. & Dennis, D. T. (1980): *Brugia malayi*: relationship between anti-sheath antibodies and amicrofilaremia in natives living in an endemic area of South Kalimantan, Borneo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **29(4)**: 553-562

Medeiros, F., Baldwin, C. I. & Denham, D. A. (1996): *Brugia pahangi* in cats: the passive transfer of anti-microfilarial immunity from immune to non-immune cats. *Parasite Immunology* **18(2)**: 79-86

Medzhitov, R. (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **1**: 135-145

Michael, E., Bundy, D. A. & Grenfell, B. T. (1996): Re-assessing the global prevalence and distribution of lymphatic filariasis. *Parasitology* **112**: 409-428

-
- Milishnikov, A. N., Lavrenchenko, L. A. & Lebedev, V. S. (2004):** Origin of the house mice (superspecies complex *Mus musculus* sensu lato) from the Transcaucasian region: A new look at dispersal routes and evolution. *Genetika* **40(9)**: 1234-1250
- Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. & Martin, D. I. (1996):** Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93(23)**: 13014-13019
- Morrisette, N., Gold, E. & Aderem, A. (1999):** The macrophage - a cell for all seasons. *Trends in Cell Biology* **9**: 199-201
- Mosmann, T. R., Cherwinsky, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. (1986):** Two types of murine helper T-cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* **136**: 2348-2357
- Murphy, K. M., Ouyang, W., Szabo, S. J., Jacobson, N. G., Guler, M. L., Gorham, J. D., Gubler, U. & Murphy, T. L. (1999):** T helper differentiation proceeds through Stat1-dependent, Stat4-dependent and Stat4-independent phases. *Current Topics of Microbiology and Immunology* **238**: 13-26
- Müller, C. A., Autenrieth, I. B. & Peschel, A. (2005):** Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences* **62(12)**: 1297-1307
- Nakatani, Y., Yamazaki, M., Chazin, W. J. & Yui, S. (2005):** Regulation of S100A8/A9 (calprotectin) binding to tumor cells by zinc ion and its implication for apoptosis-inducing activity. *Mediators of Inflammation* **2005(5)**: 280-292
- Nau, G. J., Richmond, J. F. L., Schlesinger, A., Ezra, A., Jennings, G., Lander, E. & Young, R. S. (2002):** Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science* **99(3)**: 1503-1508
- Ndiaye, M., Dhivert-Donnadieu, H. & Demoly, P. (2003):** Specific immunotherapy for respiratory allergies. A modern treatment. *Presse Medicale* **32(32)**: 1508-1516

Nowak, R. M. (1999): Walker's Mammals of the World – Volume 2, 6th Edition. The John Hopkins University Press, Baltimore.

Nowak, U. M. & Newkirk, M. M. (2005): Rheumatoid factors: good or bad for you? *International Archives of Allergy and Immunology* **138(2)**: 180-188

Noyce, R. S., Collins, S. E. & Mossman, K. L. (2006): Identification of a novel pathway essential for the immediate-early, interferon-independent antiviral response to enveloped virions. *Journal of Virology* **80(1)**: 226-235

Nutman, T. B., Steel, C., Zea-Flores, G. & Ottesen, E. A. (1991): Immunity to onchocerciasis: Recognition of larval antigens by humans putatively immune to *Onchocerca volvulus* infection. *The Journal of Infectious Diseases* **163**: 1128-1133

Ochsenbein, A. F., Fehr, T., Lutz, C., Suter, M., Brombacher, F., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1999): Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* **286(5447)**: 2156-2159

Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., Perry, A. & Cheng, G. (2006): Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* **439(7073)**: 208-211

Ogden, C. A., Kowalewski, R., Peng, Y., Montenegro, V. & Elkon, K. B. (2005): IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* **38(4)**: 259-264

Ohno, T., Ishih, A., Tanaka, S., Masahiko, N. & Terada, M. (2002): Chromosomal mapping of host susceptibility loci to *Angiostrongylus costaricensis* nematode infection in mice. *Immunogenetics* **53**: 925-929

Ono, S. & Mochizuki, H. (2000): Cytokine production in surgical stress. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* **101(9)**: 582-587

Oppenheim, J. J., Biragyn, A., Kwak, L. W. & Yang, D. (2003): Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Annals of the rheumatic diseases* **62(2)**: 17-21

Pacheco, G. (1974): Relationship between the number of circulating microfilariae and the total population of microfilariae in a host. *The Journal of Parasitology* **60(5)**: 814-818

Paciorkowski, N., Porte, P., Shultz, L. D. & Rajan, T. V. (2000): B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *The Journal of Experimental Medicine* **191(4)**: 731-736

Pantelouris, E. M. (1968): Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* **217**: 370-371

Parish, C. R. (1971)¹: Immune response to chemically modified flagellin. I. Induction of antibody tolerance to flagellin by acetoacetylated derivatives of the protein. *The Journal of Experimental Medicine* **134(1)**: 1-20

Parish, C. R. (1971)²: Immune response to chemically modified flagellin. II. Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity. *The Journal of Experimental Medicine* **134(1)**: 21-47

Parish, C. R. (1973): Immune response to chemically modified flagellin. IV. Further studies on the relationship between humoral and cell-mediated immunity. *Cellular Immunology* **6(1)**: 66-79

Parish, C. R. & Liew, F. Y. (1972): Immune response to chemically modified flagellin. 3. Enhanced cell-mediated immunity during high and low zone antibody tolerance to flagellin. *The Journal of Experimental Medicine* **135(2)**: 298-311

Park, M. K., Hoffmann, K. F., Cheever, A. W., Amichay, D., Wynn, T. A. & Farber, J. M. (2001): Patterns of chemokine expression in models of *Schistosoma mansoni* inflammation and infection reveal relationships between type 1 and type 2 responses and chemokines in vivo. *Infection and Immunology* **69(11)**: 6755-6768

Parsons, J. C., Coffman, R. L. & Grieve, R. B. (1993): Antibody to interleukin 5 prevents blood and tissue eosinophilia but not liver trapping in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunology* **15**: 501-508

Passegué, E. & Wagner, E. F. (2000): JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16INK4a expression. *The EMBO Journal* **19(12)**: 2969–2979

Pearlman, E., Hazlett, F. E. Jr, Boom, W. H. & Kazura, J. W. (1993): Induction of murine T-helper-cell responses to the filarial nematode *Brugia malayi*. *Infection and Immunity* **61(3)**:1105-1112

Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M. C. & Reth, M. (2002): B Cell Progenitors Are Arrested in Maturation but Have Intact VDJ Recombination in the Absence of Ig- α and Ig- β . *The Journal of Immunology* **169**: 865-872

Pennisi, E. (2000): A Mouse Chronology. *Science* **288**: 248-257

Petit, G., Diagne, M., Marechal, P., Owen, D., Taylor, D. & Bain, O. (1992): Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice: Comparative susceptibility of nine other inbred strains. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **67**: 144-150

Pfaff, A. W. (1997): Immunregulation bei der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides sigmodontis* Chandler, 1931 in der Labormaus. Staatsexamensarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Pfaff, A. W. (2001): Untersuchungen zur Immunregulation und Evaluation von Vakzinekandidaten im Filariosemodell *Litomosoides sigmodontis* in der Labormaus. Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Pfaff, A. W., Schulz-Key, H., Soboslay, P. T., Geiger, S. M. & Hoffmann, W. H. (2000) ¹: The role of nitric oxide in the innate resistance to microfilariae of *Litomosoides sigmodontis* in mice. *Parasite Immunology* **22(8)**: 397-405

-
- Pfaff A. W., Schulz-Key, H., Soboslay, P. T., Geiger, S. M. & Hoffmann, W. H. (2000)²:** *Litomosoides sigmodontis*: dynamics of the survival of microfilariae in resistant and susceptible strains of mice. *Experimental Parasitology* **94(2)**: 67-74
- Pfaff, I. (1996):** Immunantwort eines resistenten und eines empfänglichen Mäusestammes nach Infektion mit der Baumwollrattenfilarie *Litomosoides sigmodontis*. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M. & Mak, T. W. (1993):** Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73(3)**: 457-467
- Piessens, W. F. & da Silva, W. D. (1982):** Complement-mediated adherence of cells to microfilariae of *Brugia malayi*. *The American Journal Tropical Medicine and Hygiene* **31(2)**: 297-301
- Playfair, J. H. & Taverne, J. (1987):** Antiparasitic effects of tumour necrosis factor in vivo and in vitro. *Ciba Foundation Symposium* **131**: 192-205
- Powrie, F. & Maloy, K. J. (2003):** Immunology. Regulating the regulators. *Science* **299(5609)**: 1030-1031
- Pupko, T. & Graur, D. (1999):** Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: role of length and number of repeated units. *Journal of Molecular Evolution* **48(3)**: 313-316
- Quinnell, R. J. (2003):** Genetics of susceptibility to human helminth infection. *International Journal for Parasitology* **33(11)**: 1219-1231
- Rainbird, M. A., Macmillan, D. & Meeusen, E. N. (1998):** Eosinophil-mediated killing of *Haemonchus contortus* larvae: effect of eosinophil activation and role of antibody, complement and interleukin-5. *Parasite Immunology* **20**: 93-103

Rajan, B., Ramalingam, T. & Rajan, T. V. (2005): Critical role for IgM in host protection in experimental filarial infection. *The Journal of Immunology* **175(3)**: 1827-1833

Rao, U. R., Kwa, B. H., Nayar, J. K. & Vickery, A. C. (1989): Lectin binding to larval stages of *Brugia patei*. *International Journal for Parasitology* **19(6)**: 689-690

Ravichandran, M., Mahanty, S., Kumaraswami, V., Nutman, T. B. & Jayaraman, K. (1997): Elevated IL-10 mRNA expression and downregulation of Th1-type cytokines in microfilaraemic individuals with *Wuchereria bancrofti* infection. *Parasite Immunology* **19(2)**: 69-77

Reid, S. & Snow, E. C. (1996): The regulated expression of cell cycle-related proteins as B-lymphocytes enter and progress through the G1 cell cycle stage following delivery of complete versus partial activation stimuli. *Molecular Immunology* **33(14)**: 1139-1151

Robertson, M. (1998): Innate immunity. *Current Biology* **8**: R595-R597

Rotman, H. L., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Gleich, G. J., Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. (1996): *Strongyloides stercoralis*: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Experimental Parasitology* **82(3)**: 267-278

Roussel, M. F. (1997): Regulation of cell cycle entry and G1 progression by CSF-1. *Molecular Reproduction and Development* **46(1)**: 11-18

Scharton-Kersten, T. & Scott, P. (1995): The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of Leukocyte Biology* **57(4)**: 515-522

Schenk, B. I., Petersen, F., Flad, H. D. & Brandt, E. (2002): Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *The Journal of Immunology* **169(5)**: 2602-2610

Schmidt-Oehm, A. (2006): (Titel stand bei Drucklegung der vorliegenden Arbeit noch nicht fest). Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Schoch, C., Dugas, M., Kern, W., Kohlmann, A., Schnittger, S. & Haferlach, T. (2004): “Deep insight“ into microarray technology. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. Mai 2004. URL:

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/MicroarrayTechnologyID20045.html>

Schumacher, S. (2002): *Litomosoides sigmodontis* (Filarioidea, Nematoda) in der Labormaus: Züchtung von Mikrofilariämie-resistenten bzw. -empfindlichen kongenen Labormausstämmen und Vergleich ihres immunologischen und genetischen Status. Diplomarbeit der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Schwarz, E. & Schwarz, H. K. (1943): The wild and commensal stocks of the house mouse, *Mus musculus* Linnaeus. *Journal of Mammalogy* **24(1)**: 59-72

Semnani, R. T., Liu, A. Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J. K. & Nutman, T. B. (2003): *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. *The Journal of Immunology* **171(4)**: 1950-1960

Shellenberger, T. D., Wang, M., Gujrati, M., Jayakumar, A., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Ioannides, C. G., Efferson, C. L., El-Naggar, A. K., Roberts, D., Clayman, G. L. & Frederick, M. J. (2004): BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Research* **64(22)**: 8262-8270

Sher, A. & Coffman, R. L. (1992): Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Reviews of Immunology* **10**: 385-409

Shimizu, K., Chiba, S., Saito, T., Kumano, K. & Hirai, H. (2000): Physical interaction of Delta1, Jagged1, and Jagged2 with Notch1 and Notch3 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **276(1)**: 385-359

Si-Kwang, L. (1966): Genetic influence on resistance of mice to *Nematospiroides dubius*. *Experimental Parasitology* **18**: 311

Simons, J. E., Rothenberg, M. E. & Lawrence, R. A. (2005): Eotaxin-1-regulated eosinophils have a critical role in innate immunity against experimental *Brugia malayi* infection. *European Journal of Immunology* **35(1)**: 189-197

Simonsen, P. E. (1983)¹: Immune reactions to *Wuchereria bancrofti* infections in Tanzania. I. Serum-mediated adherence of leucocytes to microfilariae in vitro, using serum from different groups of patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **77(6)**: 829-833

Simonsen, P. E. (1983)²: Immune reactions to *Wuchereria bancrofti* infections in Tanzania. II. Characterization of the serum-mediated adherence reaction of leucocytes to microfilariae in vitro. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **77(6)**: 834-839

Silver, L. M. (1995): Mouse Genetics: Concepts and Application. Oxford University Press, Oxford.

Skamene, E., Gros, P., Forget, A., Kongshavn, P. A. L., Charles, C. S. & Taylor, B. A. (1982): Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens. *Nature* **297**: 506-509

Snell, G. D. & Reed, S. (1993): William Ernest Castle, Pioneer Mammalian Geneticist. *Genetics* **133**: 751-753

Soboslay, P. T., Dreweck, C. M., Hoffmann, W. H., Lüder, C. G., Heukschel, C., Gorgen, H., Banla, M. & Schulz-Key, H. (1992): Ivermectin-facilitated immunity in onchocerciasis. Reversal of lymphocytopenia, cellular anergy and deficient cytokine production after single treatment. *Clinical and Experimental Immunology* **89**: 407-413

Soboslay, P. T., Geiger, S. M., Weiss, N., Banla, M., Lüder, C. G. K., Dreweck, C. M., Batchassi, E., Boatin, B. A., Stadler, A. & Schulz-Key, H. (1997): The diverse expression of immunity in humans at distinct states of *Onchocerca volvulus* infection. *Immunology* **96**: 238-244

-
- Somanath, P. R., Razorenova, O. V., Chen, J. & Byzova, T. V. (2006):** Akt1 in endothelial cell and angiogenesis. *Cell Cycle* **5(5)**: 512-518
- Spellberg, B. & Edwards, J. E. Jr. (2001):** Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* **32(1)**: 76-102
- Stambolic, V., Suzuki, A., de la Pompa, J. L., Brothers, G. M., Mirtsos, C., Sasaki, T., Ruland, J., Penninger, J. M., Siderovski, D. P. & Mak, T. W. (1998):** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95(1)**: 29-39
- Sturn, A., Quackenbush, J. & Trajanoski, Z. (2002):** Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* **18(1)**: 207-208
- Szulk, B. & Piasecki, E. (1988):** Effect of interferon, interferon inducers and growth factors on phagocytosis measured by quantitative determination of synthetic compounds ingested by mouse bone marrow-derived macrophages. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* **36**: 537-545
- Tamashiro, W. K., Ibrahim, M. S., Moraga, D. A. & Scott, A. L. (1989):** *Dirofilaria immitis*: studies on anti-microfilarial immunity in Lewis rats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40(4)**: 368-376
- Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M. & Honjo, T. (2004):** Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* **20(5)**: 611-622
- Tanji, T. & Ip, Y. T. (2005):** Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends in Immunology* **26(4)**: 193-198
- Taubert, A. & Zahner, H. (2001):** Cellular immune responses of filaria (*Litomosoides sigmodontis*) infected BALB/c mice detected on the level of cytokine transcription. *Parasite Immunology* **23(8)**: 453-462

Tautz, D. & Schlotterer, C. (1994): Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* **4(6)**: 832-837

Taylor, M. J. & Hoerauf, A. (1995): *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology Today* **15**: 437-442

Taylor, M. J., Cross, H. F. & Bilo, K. (2000): Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic *Wolbachia* bacteria. *Journal of Experimental Medicine* **191**: 1429-1436

Thompson, J. P., Crandall, R. B., Crandall, C. A. & Neilson, J. T. (1979): Clearance of microfilariae of *Dipetalonema viteae* in CBA/N and CBA/H mice. *The Journal of Parasitology* **65(6)**: 966-969

Taylor, M. J., Cross, H. F., Ford, L., Makunde, W. H., Prasad, G. B. K. S. & Bilo, K. (2001): *Wolbachia* bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunology* **23**: 401-409

Thomas, G. R., McCrossan, M. & Selkirk, M. E. (1997): Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. *Infection and Immunity* **65(7)**: 2732-2739

Thompson, J. P., Crandall, R. B., Crandall, C. A. & Neilson, J. T. (1981): Microfilaremia and antibody responses in CBA/H and CBA/N mice following injection of microfilariae of *Brugia malayi*. *The Journal of Parasitology* **67(5)**: 728-730

Thomsen, M., Yacoub-Youssef, H. & Marcheix, B. (2005): Reconstitution of a human immune system in immunodeficient mice: models of human alloreaction in vivo. *Tissue Antigens* **66(2)**: 73-82

Trinchieri, G. (1995): Interleukin-2: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual Reviews of Immunology* **13**: 251-276

Trinchieri, G. (1989): Biology of natural killer cells in innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Seminars in Immunology* **7**: 83-88

Tu, L., Fang, T. C., Artis, D., Shestova, O., Pross, S. E., Maillard, I. & Pear, W. S. (2002): Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *The Journal of Experimental Medicine* **202(8)**: 1037-1042

Ugrinovic, S., Menager, N., Goh, N. & Mastroeni, P. (2003): Characterization and development of T-Cell immune responses in B-cell-deficient (Igh-6(-/-)) mice with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection. *Infection and Immunity* **71(12)**: 6808-6819

Urnovey, S., Ansai, T., Bitko, V., Nakayama, K., Takehara, T. & Barik, S. (2006): Temporal activation of anti- and pro-apoptotic factors in human gingival fibroblasts infected with the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: potential role of bacterial proteases in host signalling. *BMC Microbiology* **6**: 26

Van Damme, J., Struyf, S. & Opdenakker, G. (2004): Chemokine-protease interactions in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **14(3)**: 201-208

Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Inoue, J., Takeda, N., Sakata, J., Mishima, Y., Hitomi, J., Yamamoto, T., Utsuyama, M., Niwa, O., Aizawa, S. & Kominami, R. (2003): Bcl11b is required for differentiation and survival of alphabeta T lymphocytes. *Nature Immunology* **4(6)**: 533-539

Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D. & Robey, E. (1997): Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* **88(6)**: 833-843

Weatherall, D. J. (1987): Common genetic disorders of the red cell and the "malaria hypothesis". *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **81**: 539-548

Weber, J. L. & Wong, C. (1993): Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* **2(8)**: 1123-1128

Wegerhof, P. H. (1977): Die Beeinflussung des Wirt-Parasit-Verhältnisses zwischen der Nagetierfilarie *Litomosoides carinii* (Nematoda: Filarioidea) und der Baumwollratte *Sigmodon hispidus* durch Injektion von Mikrofilarien. Dissertation der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen

Weller, P. F. (1997): Human eosinophils. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **100**: 283-287

Wenk, P. (1967): Der Invasionsweg der metazyklischen Larven von *Litomosoides carinii* Chandler 1931 (Filariidae). *Zeitschrift für Parasitenkunde* **28**: 240-263

WHO (1987): Expert committee of onchocerciasis. Third report. *Technical Report Series* **752**. WHO, Genf.

WHO (1994): Strategies for control of lymphatic filariasis infection and disease: report of a WHO/CTD/TDR consultative meeting, Penang, Malaysia, 22–24 August 1994. Doc. TDR/CTD/FIL/PENANG/94.1, WHO, Genf.

WHO (2002): The World Health Report 2002. WHO, Genf.

Wilson, D. E. & Reeder, D. M. (1993): Mammal Species of the World. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Wienands, J. & Engels, N. (2001): Multitasking of Ig-alpha and Ig-beta to regulate B cell antigen receptor function. *International Reviews of Immunology* **20(6)**: 679-696

Winkler, S., Willheim, M., Baier, K., Aichelburg, A., Kremsner, P. G. & Graninger, W. (1999): Increased frequency of Th2-type cytokine-producing T cells in microfilaremic loiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **60(4)**: 680-686

Wong, G. T. (2002): Speed congenics: applications for transgenic and knock-out mouse strains. *Neuropeptides* **36(2-3)**: 230-236

Wozencraft, A. O., Croft, S. L. & Slayers, G. (1985): Oxygen radical release by adherent cell populations during the initial stages of a lethal rodent malarial infection. *Immunology* **56**: 523-521

Xu, D. L., Goto, Y., Amoako, K. K., Nagatomo, T., Fujita, T. & Shinjo, T. (1996): Establishment of *Bcg*^f congenic mice and their susceptibility / resistance to mycobacterial infection. *Veterinary Microbiology* **50**: 73-79

Yamada, Y., Doi, T., Hamakubo, T. & Kodama, T. (1998): Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54(7)**: 628-640

Yazdanbakhsh, M., Sartono, E., Kruize, Y. C., Kurniawan, A., van der Pouw-Kraan, T., van der Meide, P. H., Selkirk, M. E., Partono, F., Hintzen, R. Q., van Lier, R. A., *et al.* (1993): Elevated levels of T cell activation antigen CD27 and increased interleukin-4 production in human lymphatic filariasis. *European Journal of Immunology* **23(12)**: 3312-3317

Yu, H. T. & Peng, Y. H. (2002): Population differentiation and gene flow revealed by microsatellite DNA markers in the house mouse (*Mus musculus castaneus*) in Taiwan. *Zoological Science* **19**: 475-483

Zügel, U. & Kaufmann, S. H. E. (1999): Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* **12(1)**: 19-39

7 Anhang: Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
a. M.	Arithmetisches Mittel
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation (Zelloberflächenmarker)
CIDR	Centre for Inherited Disease Research
cM	Centimorgan
d1, d2 usw.	Tag 1, Tag 2 usw.
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme Linked Immuno-Sorbent-Assay
F	Kreuzungs- oder Inzuchtgeneration
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
g	Erdbeschleunigung
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH, Neuherberg
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>i. p.</i>	intraperitoneal
<i>i. v.</i>	intravenös
L1, L2 usw.	1. Larvenstadium, 2. Larvenstadium usw.
LPS	Lipopolysaccharid
LOD	Logarithm of odds (Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit)
M	molar
MARCO	Macrophage receptor with collagenous structure
Mb	Megabasen
Mf	Mikrofilarien
<i>mfr</i>	Mikrofilarämieresistenzlocus
MHC	Major Histocompatibility Complex
n	Stichprobenumfang
N	Rückkreuzungsgeneration
OD	Optische Dichte

p	Probability (hier: Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
<i>p. i.</i>	post infectionem
PRR	Pattern-Recognition Receptor
R	Resistenzallel für <i>mfr</i>
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
s	Suszeptibilitätsallel für <i>mfr</i>
SCID	Severe combined immune deficiency
SD	Standard deviation (Standardabweichung)
Stat	Signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TH / T _H	T-Helferzellen
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

Parasitenspezies

<i>A. cantonensis</i>	<i>Angiostrongylus cantonensis</i>
<i>A. viteae</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
<i>B. malayi</i>	<i>Brugia malayi</i>
<i>B. pahangi</i>	<i>Brugia pahangi</i>
<i>B. timori</i>	<i>Brugia timori</i>
<i>D. immitis</i>	<i>Dirofilaria immitis</i>
<i>L. loa</i>	<i>Loa loa</i>
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. sigmodontis</i>	<i>Litomosoides sigmodontis</i>
<i>O. lienalis</i>	<i>Onchocerca lienalis</i>
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
<i>W. bancrofti</i>	<i>Wuchereria bancrofti</i>

Lebenslauf

Geboren

24.08.1975 in Bietigheim-Bissingen

Schulausbildung

1982 - 1986 Grünlandschule Freiberg am Neckar

1986 - 1995 Oscar-Paret-Schule Freiberg am Neckar, Abschluss mit Abitur

Studium

10/1996 - 09/1999 Biologiestudium, Universität Stuttgart-Hohenheim

10/1999 - 03/2002 Biologiestudium, Universität Tübingen

Hauptfach: Zoologie, Nebenfächer Parasitologie und Pharmakologie

06/2001 - 03/2002 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Tropenmedizin, Tübingen: „*Litomosoides sigmodontis* (Filaroidea, Nematoda) in der Labormaus: Züchtung von Mikrofilariämie-resistenten bzw. -empfindlichen kongenen Labormausstämmen und Vergleich ihres immunologischen und genetischen Status“

03/2002 Abschluss mit Diplom, Note: 1,05

Promotion

04/2002 - 09/2006 Promotion am Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen: „Innate Resistenz gegen *Litomosoides sigmodontis* in der Labormaus: Untersuchungen zu Genetik, Genomik, Parasitologie und Immunologie Mikrofilariämieresistenz-kongener Labormausstämme“

Beschäftigungsverhältnisse während Studium und Promotion

6/1999 -12/1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Zoologie, Universität Hohenheim

10/2000 - 03/2006 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Tropenmedizin, Universität Tübingen

Sonstiges

11/2002 Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs.4 Satz 2 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte für die Biologische Sicherheit