

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer**

**Immunantwort unreifer dendritischer Zellen
auf Vesikelflüssigkeit
des Parasiten *Echinococcus multilocularis***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alexander Papenheim

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Joachim Richter

Zusammenfassung

Echinococcus multilocularis gilt als einer der gefährlichsten Nematoden für den Menschen. Durch unkontrollierte Ausbreitung und das tumorartige Wachstum zerstört er unentdeckt innerhalb von Jahren das Leberparenchym und auch das anderer befallener Organe. Es ist also zu vermuten, dass dieser Parasit eine Strategie entwickelt hat, die Immunantwort zu seinen Gunsten zu modifizieren. Ich habe mich in der Arbeit auf die Funktion der dendritischen Zellen als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort und als potente T-Zell-Stimulatoren fokussiert, speziell untersucht wurden der Einfluss des Erregers auf die Zytokin- und Chemokinproduktion dendritischer Zellen und auf die T-Zell-Proliferation und die Reaktion dendritischer Zellen bzgl. Wachstum, Reifung und Proliferation auf *Echinococcus multilocularis*.

Dendritische Zellen und periphere mononukleäre Leukozyten wurden aus Humanblut gesunder Probanden isoliert und zur Chemokinmessung *in vitro* stimuliert mit LPS oder PMA, jeweils mit oder ohne Vesikelflüssigkeit, zuvor gewonnen aus Echinokokkenvesikeln intraperitoneal infizierter Gerbils. Es erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation und zudem zur Chemokinmessung eine RNA-Isolierung aus unreifen dendritischen Zellen (uDC), um mittels real-time RT-PCR die Expression bestimmte Chemokine zu messen.

Die Vesikelflüssigkeit hatte verschiedene modulierende Effekte auf die untersuchten Komponenten des Immunsystems. Es zeigten sich eine signifikante Hemmung der OKT3-stimulierten T-Zell-Proliferation, zudem eine Hemmung der Expression der proinflammatorischen Chemokine IL-1, IL-12 und CXCL10 durch mit LPS stimulierte unreife dendritische Zellen, aber eine verstärkte Expression der in erster Linie proinflammatorischen Chemokine IL-1 und CXCL1 nach direktem Kontakt zwischen uDC und Antigen. Im Falle von CXCL1 vermochte die Vesikelflüssigkeit die LPS-induzierte Chemokinproduktion sogar um ein Vielfaches zu verstärken.

Während die Relevanz der T-Zell-Proliferationshemmung trotz signifikanter Blockade eines extrazellulären Signalweges von T-Lymphozyten bezüglich Repräsentativität und Übertragbarkeit fraglich bleibt, stellen sich hier neue Modulationen immunregulatorischer Mechanismen bei Kontakt mit Echinokokkenantigenen dar. Insbesondere die Hemmung proinflammatorischer Th₁-Zytokine (IL-1, IL-12, CXCL10), aber auch die Verstärkung einer Th₁-Antwort (CXCL1) nach Direktkontakt, verdeutlichen erneut die Komplexität der immunmodulatorischen Escapemechanismen des Parasiten zwischen Th₁-Hemmung und antigenem Charakter. Einige Aspekte des erhobenen Chemokinprofils passen zu denen an getesteten Patienten mit alveolärer, aber auch zystischer Echinokokkose, besonders IL-1 und IL-12. Die Hemmung einer antiparasitären Immunantwort wird durch die hier festgestellte gehemmte IL-12-Freisetzung, ähnlich wie in anderen Studien, und auch durch die erstmals detektierte Hemmung der Freisetzung des mit IL-12 agonistisch wirkenden CXCL10 erneut unterstrichen und könnte als eine der Ursachen langer Erregerpersistenz und Chronifizierung in Frage kommen. Dem steht eine erhöhte Spontanfreisetzung von CXCL1 durch unreife dendritische Zellen, einem an sich Neutrophilen-chemotaktischen Zytokin, möglicherweise als Korrelat zum antigenen Charakter der Vesikelflüssigkeit, gegenüber.

Abkürzungsverzeichnis

ABS	AB-Serum, Pooled Humanserum der Blutgruppe AB
AG	Antigen
APC	Antigen-Presenting-Cell
BSA	Bovines Serum-Albumin
BCR	B-Cell-Receptor
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
DC	Dendritic Cells
DC-SIGN	Dendritic Cell Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
DEPC-H₂O	Diethylpyrocarbonat-Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
Eg	<i>Echinococcus granulosus</i>
Em	<i>Echinococcus multilocularis</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EVF	Echinokokken-Vesikelflüssigkeit
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
GL	Germinal Layer
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's media
kDA	KiloDalton
LFA	Leucocyte Function Antigen

LL	Laminated Layer
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Cell Sorting
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
OKT3	Muromonab-CD3 (Handelsname Orthoclone OKT3 [®])
PBL	Periphere mononukleäre Blutlymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMA	Phorbol Myristat Acetat
PenStrep	Penicillin/ Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
rt-PCR	Realtime-PCR
SCID	Severely Compromised Immunodeficiency
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor

aus Humanblut	22
2.2.2.2 Fluoreszenzaktivierte Zell-Scan-Analyse (FACS) zur Charakterisierung Dendritischer Zellen	24
2.2.2.3 Stimulation und Inkubation der DCs zur Chemokinmessung	24
2.2.3 Messung der T-Zell-Proliferation	25
2.2.4 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.4.1 RNA-Isolierung aus uDC	25
2.2.4.2 cDNA-Synthese mit RT-PCR	26
2.2.4.3 Chemokin-realtime-PCR	26
2.2.5 Proteinbiochemische Methoden	28
2.2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Bestimmung des Proteingehaltes der VF	29
3.2 Differenzierung dendritischer Zellen aus CD14+ Monozyten	29
3.3 Einfluss von VF auf die T-Zell-Rezeptor-abhängige T-Zell- Proliferation	31
3.4 Einfluss von VF auf die IL-1-Expression aus stimulierten uDCs	32
3.5 Einfluss von VF auf die IL-12-Expression stimulierter uDCs	34
3.6 Einfluss von VF auf die CXCL1-Expression aus stimulierten uDCs	35
3.7 Einfluss von VF auf die CXCL10-Expression aus stimulierten uDCs	36
3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4. Diskussion	40
4.1 Auswirkungen von <i>Echinococcus multilocularis</i> -Antigenen auf die T-Zell-Proliferation	41
4.2 Auswirkungen von <i>Echinococcus multilocularis</i> -Antigenen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine	43
5. Zusammenfassung und Ausblick	50
Literatur	52

Danksagung

Eidesstattliche Versicherung

1. Einleitung

1.1 Myeloide dendritische Zellen

Erstmals 1868 von Paul Langerhans beschrieben, gelten dendritische Zellen (DCs) heute als sehr bedeutende Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort ¹. Seit einiger Zeit ist es möglich, diese Zellen direkt aus menschlichem Blut zu isolieren und zu kultivieren und somit ihre verschiedenen Funktionen für das Immunsystem zu analysieren ².

DCs gelten als effektive Stimulatoren der B- und T-Lymphozyten. Sie gehören - neben Makrophagen und B-Zellen - zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und stellen als solche ein Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort dar ². Während B-Lymphozyten über ihren Rezeptor (B-Zell-Rezeptor, BCR) in der Lage sind, Antigene direkt zu erkennen, benötigen T-Lymphozyten ebenjene APC, die auf ihrer Oberfläche mit Hilfe von MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) Antigene binden. DCs befinden sich in fast allen Geweben als eine Art „Wächter“ und spüren dort eindringende Pathogene auf, die sie später naiven T-Zellen präsentieren ².

DCs entstehen aus pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks. Von dort aus erreichen ihre Vorläuferzellen hämatogen verschiedene Gewebe, wo sie als unreife dendritische Zellen (uDCs) agieren. Über zahlreiche Oberflächenrezeptoren, die der Antigenerkennung dienen, werden die Fremdmoleküle aufgenommen und in den Lymphknoten naiven T-Zellen präsentiert. Wahrscheinlich entwickeln sich dendritische Zellen aus CD34⁺ myeloiden und lymphoiden Progenitorzellen ². Aus beiden Arten von Vorläuferzellen können sich mit Hilfe von Wachstumsfaktoren wie z.B. GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), TNF α , IL-4, IL-3 oder TGF β verschiedene Subpopulationen von dendritischen Zellen entwickeln ³. Dazu gehören die plasmazytoiden dendritischen Zellen ⁴, die Langerhans-Zellen ⁵ und die interstitiellen dendritischen Zellen ⁶.

1.2 Interaktion dendritischer Zellen mit Mikroorganismen

1.2.1 Unreife dendritische Zellen und Antigene

Unreife dendritische Zellen sind im Besitz nur weniger MHC-Proteine und noch keiner costimulatorischer B7-Moleküle (s. u.), die essenziell sind für die T-Zell-Aktivierung ⁵. Allerdings sind sie, ähnlich den Makrophagen, in der Lage, Krankheitserreger zu detektieren und zu internalisieren. Dies geschieht durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose ¹.

Sobald sie auf ein Antigen treffen, wird es aufgenommen und in Form eines Peptid-MHC-Komplex auf der Zelloberfläche präsentiert. Hierdurch aktivierte Zellen wandern nun zu benachbarten Lymphknoten. Dendritische Zellen, die nicht aktiviert wurden, gewährleisten eine Immuntoleranz gegenüber den Antigenen des eigenen Körpers ^{5, 2}.

Nach Aufnahme eines Antigens verliert eine dendritische Zelle schnell die Fähigkeit, weitere Antigene zu binden und zu prozessieren. Ihre Morphologie verändert sich durch die Ausbildung langer Dendriten, was der Oberflächenvergrößerung dient ². Denn nun ist ihre Hauptaufgabe die Antigenpräsentation mit Hilfe zahlreicher MHC- und ko-stimulatorischer Moleküle. Man spricht nun von reifen dendritischen Zellen (rDC). Sie sind in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren und deren Vermehrung und Differenzierung zu T-Effektor Zellen zu veranlassen ².

Dieser Vorgang ist auf weitere ko-stimulatorische Signale angewiesen. Hierzu zählen vor Allem die Proteine der B7-Familie, die an die Proteine CD28 und CTLA-4 auf der T-Zell-Oberfläche binden, das CD40-Molekül (bindet am CD40-Ligand an der T-Zelle) ⁵, die Bindung zwischen LFA-1 (leucocyte function antigen) und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) zur optimalen Zell-Zell-Adhäsion ⁷ und die Verbindung von ICAM-3 (T-Zelle) und DC-SIGN (dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin) ².

1.2.2 Dendritische Zellen und Zytokinproduktion

Dendritische Zellen gehören, wie auch Makrophagen, dem angeborenen Immunsystem an und sind die Immunzellen, die zeitlich als erste in Kontakt mit eindringenden Antigenen wie Fremdkörper oder Mikroorganismen treten. Nach Aktivierung setzen sie Zytokine frei, welche die angeborene sowie die erworbene Immunantwort beeinflussen. Dabei können sie sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken^{5, 2}.

Eine zusätzliche Einteilung der Zytokine liegt in der Unterscheidung zwischen Th₁- und Th₂-Zytokinen: Th₁-Zytokine sind Zytokine, die eine eher zelluläre Immunantwort hervorrufen, vor Allem durch Aktivierung zytotoxischer Zell-Zell-Kontakte. Beteiligt sind dabei meist zytotoxische T-Zellen. Zu den Th₁-Zytokinen gehören zum Beispiel die Interleukine IL-1, IL-6 und IL-12, außerdem TNF α und IFN γ . Im Rahmen einer Th₂-Antwort erfolgt die Aktivierung des Immunsystems eher auf Seiten der humoralen Immunität. So differenzieren sich B-Zellen zu Plasmazellen, welche Antikörper produzieren und freisetzen. Th₂-Zytokine sind beispielsweise IL-4, IL-5 und IL-10⁵.

Ein wichtiger Vertreter der proinflammatorischen Zytokine ist beispielsweise TNF α , welches neben der Induktion von Akut-Phase-Proteinen einen Anstieg der Körpertemperatur, eine Aktivierung neutrophiler Granulozyten, deren Adhäsion an das Endothel und deren Extravasation begünstigt². Außerdem fördert es durch Freisetzung chemotaktischer Substanzen eine gesteigerte Migration dendritischer Zellen aus der Peripherie in die regionalen Lymphknoten⁸ und besitzt eine immunregulatorische Komponente, denn es verstärkt in T-Zellen die Expression von HLA-DR-Molekülen und IL-2-Rezeptoren und die Produktion von IFN γ ⁹. Auf einen geeigneten Reiz hin (besonders bakterielles LPS) produzieren dendritische Zellen innerhalb kürzester Zeit große Mengen TNF α ¹⁰.

Als weiterer wichtiger Vertreter der proinflammatorischen Zytokine ist das IL-1 zu nennen. IL-1 wird hauptsächlich von Blut-Monozyten, wenig auch von dendritischen Zellen produziert und spielt eine zentrale Rolle in der Antwort des Organismus auf eine Reihe von Fremdeinflüssen. Insbesondere LPS ist in der Lage, die betroffenen Zellen zu einer enormen IL-1-Freisetzung anzuregen, was in

vivo Fieber, Neutrophilie, Thrombozytose, einen Anstieg der Akut-Phase-Proteine und des zirkulierenden Interleukin-6 bewirkt ¹¹.

Das proinflammatorische Interleukin-12 besitzt eine zentrale Funktion in der Stimulation und Fortdauer einer Th₁-Antwort und hat Einfluss auf den Verlauf von intrazellulären Infektionen. Es wird von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und hauptsächlich von B-Lymphozyten produziert. Starke Reize dazu sind Bakterien oder deren Produkte, aber auch Parasiten. Werden uDCs in vitro mit LPS stimuliert, sind sie ebenfalls in der Lage, hohe Mengen an IL-12 zu produzieren ¹².

1.2.3 Chemokine

Eine weitere sehr bedeutende Gruppe von Botenstoffen des Immunsystems, die nicht nur in einem besonderen Verhältnis zu dendritischen Zellen, sondern zu praktisch allen Zellen des Immunsystems stehen, stellt die Gruppe der Chemokine dar.

Chemokine (ursprünglich abstammend aus dem Begriff „chemotaktische Zytokine“) sind eine Gruppe der Zytokine, die bei Zellen eine Chemotaxis auslösen. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung, Homöostase, Regulation und Funktion des Immunsystems ¹³ und somit auch bei verschiedensten Krankheitsprozessen, besonders Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, Infektionskrankheiten und auch Neoplasien ¹⁴.

Viele Chemokine regulieren die Migration und Diapedese von Leukozyten oder unterstützen die Entwicklung und Differenzierung einer Th₁- oder Th₂-Antwort. Es ist dabei bekannt, dass Th₁-Zellen weitaus mehr Chemokine freisetzen als Th₂-Zellen ¹⁵.

Manche Chemokine wirken zusätzlich aktivierend auf Leukozyten, einige sind an der Organentwicklung und der Angiogenese beteiligt. Die ungefähr 50 unterschiedlichen Chemokine werden von Zellen des Immunsystems und vielen Gewebezellen, zum Beispiel Fibroblasten, produziert. Ihre für ein intaktes

Immunsystem essenzielle Wirkung entfalten sie nach Bindung an (bisher 18 nachgewiesen funktionell aktive) Chemokinrezeptoren, welche G-Proteingekoppelt sind^{13 16}. Chemokine zeichnen sich aus durch ihre Rezeptorredundanz und Bindungspromiskuität; das heißt, dass ein Chemokin an verschiedenen Rezeptoren bindet und umgekehrt ein Rezeptor auch mehrere unterschiedliche Liganden aufweist, deren Signale entsprechend weitergeleitet werden¹³.

Bei den Chemokinen handelt es sich um Polypeptide, die aus ca. 75–125 Aminosäuren bestehen und eine Molmasse von 8 bis 14 kDa aufweisen¹⁶. Aufgrund ihrer Struktur (genauer der Anzahl und Position der Cysteinreste am Amino-Terminus) kann man vier Untergruppen der Chemokine unterscheiden:

1.) die **CC-Chemokine** (die ersten beiden Cysteine folgen direkt aufeinander)

Hierzu gehören 24 Chemokine, deren Wirkung sich bevorzugt auf Neutrophile Granulozyten und T-Zellen richtet.

2.) die **CXC-Chemokine** (die ersten beiden Cysteine sind durch eine Aminosäure voneinander getrennt)

Einige CXC-Chemokine gelten als potente Promotoren der Angiogenese, während andere CXC-Chemokine antiangiogenetisch wirken^{17, 18}. Die Rezeptoren für diese Chemokine finden sich oft auf Monozyten, Eosinophilen, Basophilen und T-Zellen. Desweiteren spielen einige CXC-Chemokine eine wichtige Rolle bei der Lymphozytenentwicklung¹⁹.

3.) die **CX3C-Chemokine** (die ersten beiden Cysteine sind durch drei Aminosäuren voneinander getrennt).

Hierzu gehört ausschließlich das Fraktalkin. Fraktalkine wirken auf T-Lymphozyten und Monozyten und regulieren die Leukozytenmigration.

Bei diesen drei Chemokinfamilien werden immer zwei Disulfidbrücken gebildet.

4.) die **C-Familie**.

Im Gegensatz dazu liegt bei dieser Familie nur ein konserviertes Cystein am Amino-Terminus vor; es wird außerdem nur eine Disulfidbrücke ausgebildet. XCL1 (auch Lymphotactin oder ATAC), deren einziger Vertreter, wird vor allem von

aktivierten CD8 T-Zellen und von NK-Zellen freigesetzt. Es spielt eine Rolle bei der Immunantwort gegen Tumoren^{20, 18}.

Die systematischen Namen der einzelnen Chemokine setzen sich aus der Bezeichnung der Familie (CC, CXC, CX3C, XC), dem Buchstaben L für Ligand und einer fortlaufenden Nummerierung zusammen. Daneben finden sich in der Literatur zudem noch häufig die Bezeichnungen, die ihnen bei der Erstbeschreibung gegeben wurden (Beispiele: GRO α =CXCL1, IP10=CXCL10, SDF1=CXCL12, MIP1 α =CCL3, TARC=CCL17 und Lymphotactin=XCL1).

Die Hauptfunktion der Chemokine besteht wie schon erwähnt in der Induktion einer Chemotaxis. Hierbei lassen sich die Chemokine funktionell in zwei weitere Gruppen strukturieren, nämlich in inflammatorische (oder auch induzierbare) und homöostatische (oder konstitutive) Chemokine.

Ein Großteil aller Chemokine gehört den inflammatorischen Zytokinen an. Ihre Produktion wird meist durch äußere oder innere Reize (z.B. Verletzung, Infektion oder sonstige akut oder chronisch entzündliche Veränderung im Organismus) ausgelöst, und ihre Freisetzung durch Leukozyten, Epi- oder Endothelzellen und Fibroblasten wirkt chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems¹⁶.

Zu dieser Gruppe gehört beispielsweise CXCL1. Es wird freigesetzt von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen. Wie einige weitere Chemokine der CXC-Gruppe ist es Ligand am Chemokinrezeptor CXCR2. Dieser befindet sich größtenteils auf neutrophilen, aber auch auf eosinophilen und basophilen Granulozyten, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und Makrophagen. Über diesen Rezeptor wird via G-Protein-gekoppelte Signalwege vor allem die Neutrophilenchemotaxis, besonders die Rekrutierung von Leukozyten in inflammatorisches Gewebe, und Angiogenese (damit verbunden auch Beteiligung am Tumorwachstum) vermittelt.

CXCL10 gehört ebenfalls zur Gruppe der inflammatorischen Chemokine und wird meist nach einem Primärreiz durch IFN- γ im Rahmen einer Entzündungsreaktion von verschiedenen Zellen, vor allem Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten freigesetzt. CXCL10 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen, T-

Lymphozyten, NK-Zellen und dendritische Zellen. Es spielt eine zentrale Rolle bei der T-Zell-Adhäsion am Endothel und an der gesamten Th₁-Reaktion. Im Gegensatz zu CXCL1 hemmt es die Angiogenese und damit auch das Tumorwachstum. Wie CXCL9 und CXCL11 ist es Ligand am Chemokinrezeptor CXCR3, der sich auf den oben genannten Zellen befindet. Die Signalwege laufen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ras-map-Kinasen ab.

Homöostatische Chemokine hingegen werden permanent und relativ reizunabhängig in bestimmten Regionen produziert und sind an der Organisation von lymphoiden Organen und der Überwachung von intaktem Gewebe beteiligt. Zu dieser Gruppe gehören CCL18, CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13 und CXCL14.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass es ein besonderes Verhältnis zwischen Dendritischen Zellen und CC-Chemokinen gibt. DCs produzieren, teilweise hochspezifisch, verschiedene Chemokine, zum Beispiel CCL17²¹ oder CCL25²². uDCs exprimieren CCR6 und beantworten somit durch CCL20 ausgelöste Reize in vitro²³. Reifende DCs hingegen weisen an ihrer Oberfläche CCR7 auf²⁴, um die Lymphknoten erreichen zu können. Dies wird verstärkt durch die Agonisten CCL19 und 21²⁵.

Einige Chemokine können nicht eindeutig einer der beiden Kategorien zugeordnet werden, da ihre Wirkungen nicht eindeutig erscheinen. CXCL10 gehört beispielsweise bei einigen Autoren zu diesen Chemokinen.

1.3 Biologie von *Echinococcus multilocularis*

1.3.1 Allgemeines

Echinococcus multilocularis (dt. Fuchsbandwurm, auch der sog. „gefährliche kleine Fuchsbandwurm“) ist in die Gruppe der Helminthen, genauer der Taeniidae aus der Ordnung der Cyclophyllidea (Eucestoden) einzuordnen².

Echinococcus multilocularis (Abb. 1) ist der Erreger der alveolären Echinokokkose (AE), einer chronischen infiltrativen Erkrankung, die in erster Linie die Leber betrifft (möglich ist zusätzlich ein Befall von Lunge, Gehirn, Knochen, Herz, Milz und sehr selten weiteren Organen). Unbehandelt ist die AE gekennzeichnet durch eine außergewöhnlich hohe Letalität (über 90%), die nicht zuletzt dadurch zustande kommt, dass die Erkrankung meist lange (10 bis 15 Jahre) asymptomatisch, „latent“ verläuft und daher erst sehr spät diagnostiziert wird. Diese Tatsache zeigt, wie wichtig Kenntnisse über Pathogenitätsmechanismen und Therapieprinzipien für das Verständnis, die Prognose und die Behandlungserfolge der AE sind²⁶.

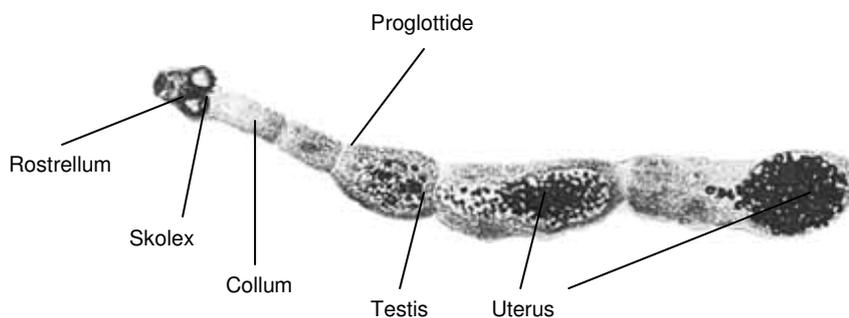


Abb. 1: *Echinococcus multilocularis*: Adulter Wurm

Quelle: <http://www.tierarzt-ahaus.de/infos/wuermer.html>

1.3.2 Epidemiologie

Das Vorkommen von *Echinococcus multilocularis* ist überwiegend in einem Gürtel in der nördlichen Hemisphäre zu verzeichnen, der Regionen in Mittel- und Osteuropa, Nordost-Asien (Sibirien) und Nordamerika (Alaska mit Inseln des Beringmeers) beinhaltet. Was Europa betrifft, wurde *Echinococcus multilocularis* bei Füchsen nachgewiesen: in Frankreich, Belgien, Luxemburg, der Schweiz,

Österreich, Liechtenstein, in der Slowakei, Tschechei und Polen. In Deutschland waren bis zum Jahr 2000 12 von 16 Bundesländern betroffen. Hochendemiegebiete finden sich vorwiegend in der Schweiz, der Schwäbischen Alb und im Jura.

Inwieweit jedoch der Fuchs eine infektiöse Gefahrenquelle für den Menschen darstellt, ist bis heute nicht vollständig geklärt; vielmehr wird auf die Gefahr hingewiesen, die von Hunden in den besagten Endemiegebieten ausgeht. Hunde jagen die diversen Zwischenwirte (zum Beispiel Mäuse), sind hochempfindlich für *E. multilocularis* (im Gegensatz zu Katzen) und verschleppen die Erreger und deren Eier auf diesem Wege direkt in die häusliche Umgebung und die Kontaktzonen seiner menschlichen Besitzer^{27, 26}.

Die Inzidenz der AE ist relativ gering. Die Erkrankung tritt vorwiegend in den erwähnten Gebieten Mitteleuropas auf mit jährlichen Inzidenzraten von 0,02 bis 1,4 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Regional können die Inzidenzraten wesentlich über den Durchschnittswerten liegen. Dies ist in den Hochendemiegebieten der Fall. Insgesamt wurden in Europa zwischen 1982 und 2000 lediglich 559 Fälle der AE gemeldet, wobei jedoch zu berücksichtigen ist, dass die tatsächliche Zahl der Fälle nicht bekannt ist, da erst im Jahre 2000 mit einer systematischen Erfassung der AE-Fälle begonnen worden ist. Dies erfolgt über das Robert-Koch-Institut (RKI) und das Europäische Echinokokkose-Register (ERR). Bis Ende 2005 wurden dort insgesamt 233 Fälle von AE gemeldet²⁸. Das Robert-Koch-Institut erfasste im Jahre 2001 11 Fälle von alveolärer Echinokokkose in Deutschland². In den letzten Jahren stellte sich jedoch heraus, dass trotz der bestehenden Meldepflicht diese Überwachungssysteme nur 30% der tatsächlichen Infektionen mit dem Erreger in Deutschland erfasst haben. Daher ist bei zwischen 2003 und 2005 gemeldeten 60 Fällen in der Bundesrepublik von weitaus mehr Erkrankungen auszugehen. Gründe dafür könnten laut dem Bund deutscher Internisten (BDI) ein mangelndes Bewusstsein der Ärzte über die Meldepflicht, aber auch die lange und aufwändige Meldeprozedur sein²⁹.

1.3.3 Lebenszyklus im Menschen

Echinococcus multilocularis ist physiologischerweise vorwiegend im Dünndarm von Rot- und Polarfuchs, gelegentlich auch von Hund oder Katze (seltener) als adulter Wurm zu finden. Der genaue Ablauf des Infektions- und Lebenszyklus ist im folgenden Bild (Abb. 2) dargestellt.

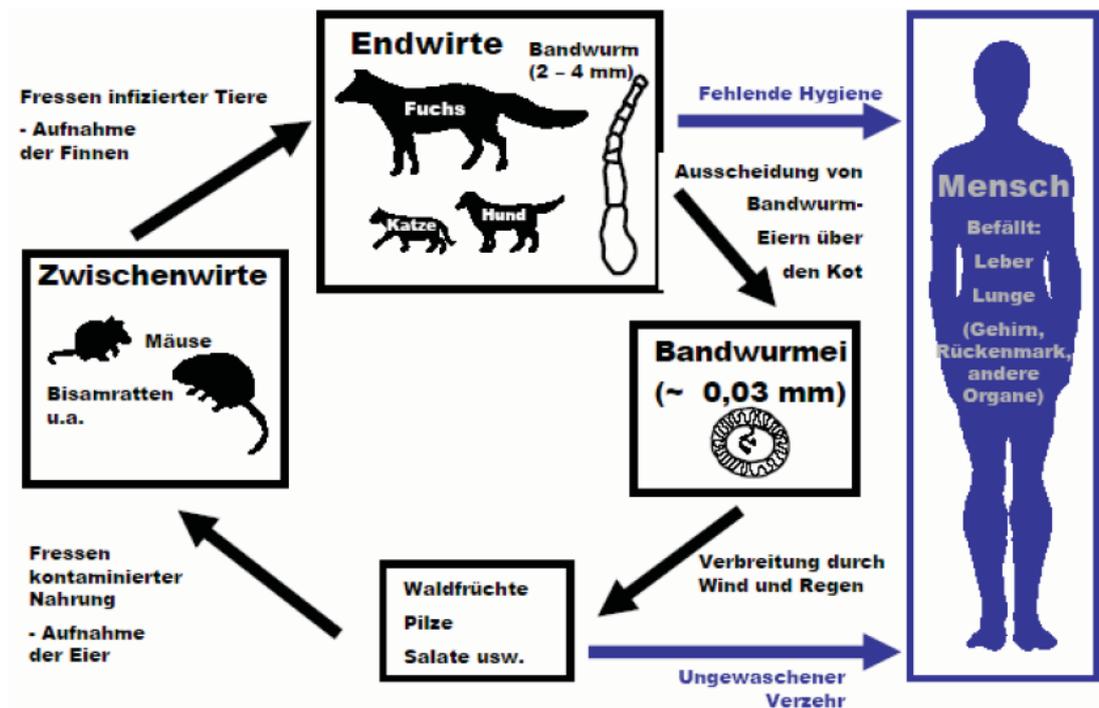


Abb. 2: Lebenszyklus *E. multilocularis*

Quelle: http://www.cvuas.de/pub/beitrag.aspx?subid=1&Thema_ID=8&ID=209&Pdf=No

Mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. Thomas Romig, Universität Hohenheim

Bei einem möglichen Befall funktioniert der Mensch neben zahlreichen Nagetieren als Zwischenwirt, wobei eine Aufnahme der infektiösen, äußerst kältebeständigen Parasiteneier ausschließlich auf fäkal-oralem Übertragungsweg zustande kommt, nämlich durch die Ingestion von mit Fuchsexkrement (oder auch -urin) kontaminierten, nicht ausreichend gereinigten Waldbeeren, Pilzen oder Salatblättern. Auch ist eine indirekte Übertragung durch mit Parasiteneiern kontaminiertes Trinkwasser möglich. Die daraufhin im menschlichen Dünndarm schlüpfenden Onkosphären sind in der Lage, die Darmwand zu penetrieren und auf dem Lymph- und Blutweg (Mesenterialvenen, Pfortader) in die Leber zu gelangen. Die sich entwickelnden Larven (Finnen) können nun unter der Bildung von millimeter- bis zentimetergroßen Vesikeln infiltrativ in das umliegende

menschliche Gewebe hineinwachsen und gleichsam hämatogen in weitere Organe (Lunge, ZNS, Knochen, Herz, Gehirn etc.) „metastasieren“. Die äußere Schicht der Vesikel stellt die Grenzschrift zum Wirtsgewebe und damit die einzige Kontaktzone zwischen Parasit und Wirtsorganismus dar und wird als Laminarschicht (Laminated Layer, LL) bezeichnet. Diese Schicht scheint eine zentrale Rolle hinsichtlich der Pathogenitätsmechanismen der AE zu spielen. Der LL umgibt die so genannte Keimschicht (Germinal Layer, GL), innerhalb deren Flüssigkeit (Vesikelflüssigkeit, VF) die Bandwurmlarven zu finden sind. Die Vesikel sind vergrößerungs- und vermehrungsfähig. Diese Prozesse geschehen innerhalb einer gemeinsamen Laminarschicht, so dass die meist zahlreichen Mutter- und Tochtervesikel immer untereinander in Verbindung stehen³⁰.

Bei infizierten Mäusen und bei 5% der infizierten Menschen entwickeln sich in den Vesikeln Kopfanlagen (Protoskolizes, Abb. 3a und 3b). Metazestoden mit Protoskolizes sind so nach erneuter Ingestion in der Lage, im Dünndarm des folgenden Endwirtes (Fuchs, Hund, Katze) innerhalb eines Monats erneut infektiöse Eier zu produzieren und so den Lebenszyklus über Generationen aufrecht zu erhalten. Bei Endwirten dauert die Ausscheidung der Eier ca. 1-4 Monate; die Lebensdauer der Würmer im Wirtsorganismus beträgt schätzungsweise 2-5 Monate, wobei Endwirte vor Reinfektionen nie geschützt sind.



Abb. 3a) und 3b): Ausgestülpter Protoscolex von *E. multilocularis*.

Aus Voigt N. Immunregulation des Humanparasiten *Echinococcus multilocularis* . Institut für Med. Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2008

1.3.4 Klinik der alveolären Echinokokkose beim Menschen

Die klinische Problematik der alveolären Echinokokkose beim Menschen ist im Wesentlichen durch das exogene Aussprossen (also das Bilden von Tochtervesikeln), das infiltrative Wachstum und die Metastasierung der Metazestoden zu erklären. In 98% aller klinischen Fälle ist die Leber betroffen.

Klinisch fassbar wird eine AE bei den meisten Patienten erst nach einer relativ langen Inkubations- bzw. Latenzzeit, die in der Regel zwischen 5 und 15 Jahren liegt. Ein Großteil der Betroffenen wird anschließend beim Arzt aufgrund unspezifischer Symptome vorstellig, meist sind das Oberbauchschmerzen oder Ikterus. Bei ungefähr jedem siebten AE-Patienten wird die Erkrankung zufällig im Rahmen anderer Untersuchungen diagnostiziert ³¹. Dabei beträgt das mittlere Alter der Patienten um die 50 Jahre. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung können bereits gravierende Organschädigungen vorliegen wie Hepatomegalie mit Cholestase oder Ikterus, sekundäre biliäre Zirrhose, Cholangitis, Pankreatitis, Leberabszesse, portale Hypertension oder eine Vena-cava-Thrombose. Zu den lebensbedrohlichen Komplikationen gehört die Zystenruptur mit peritonealer Dissemination und folgender Peritonitis bis hin zum anaphylaktischen Schock. Die Symptomatik bei einem schweren hepatischen Verlauf erklärt sich aus der Verdrängung und Obstruktion lebenswichtiger Organstrukturen wie der Lebervenen oder Gallengänge ²⁶. Im (seltenen) Falle eines Lungenbefalls können Lunge und Mediastinum in Form von tumorähnlichen Läsionen, Pneumothorax, Pleuritis, Lungenabszess, eosinophiler Pneumonitis oder Lungenembolie geschädigt werden. In sehr seltenen Fällen werden auch Schädigungen von Herz, Gehirn und Knochen bzw. Wirbelsäule in Form tumorähnlicher Läsionen festgestellt. Die lange Latenzzeit schützt somit offenbar keinesfalls vor möglichen schweren Erkrankungsformen und der (unbehandelt) hohen Letalität, die 10 bis 14 Jahre nach Diagnosestellung 94 bis 100% erreichen kann ^{26, 32}.

Bei der alveolären Echinokokkose gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Verlaufsformen: Zum Einen können Parasiten bei symptomatischen oder auch asymptomatischen Patienten nachgewiesen werden, zum Anderen gibt es symptomlose Personen ohne klinisch nachweisbare Läsionen, aber mit einer spezifischen Immundiagnose. In diesem Fall wurde die Infektion in einem

Frühstadium der Erkrankung bereits eigenständig bekämpft, so dass Antikörper im Serum nachweisbar bleiben ²⁶.

Die Diagnostik der alveolären Echinokokkose beinhaltet im Wesentlichen bildgebende Verfahren, verbunden mit immundiagnostisch-serologischen Methoden. Anamnestisch ergeben sich meist keine erinnerlichen Hinweise auf einen Erregerkontakt, die klinische Symptomatik ähnelt bekanntermaßen meist der von tumorösen, zirrhotischen oder entzündlichen Lebererkrankungen, die differentialdiagnostisch verständlicherweise im Vordergrund stehen. Erste Hinweise auf die parasitäre Erkrankung kann die Sonographie liefern, weiterführende dann eine kontrastmittelunterstützte Computertomographie (CT) der Oberbauchorgane. Die Kombination dieser beiden bildgebenden Verfahren ist die diagnostische Methode der Wahl bei primärem Leberbefall ²⁶. Sekundäre Veränderungen, zum Beispiel die Kompression der V. cava oder der Vv. hepaticae, können bei entsprechendem Verdacht mittels der Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt werden.

Eine weitere wichtige Rolle, insbesondere bei der Frühdiagnostik einer AE, kommt der Serologie in Form von ELISAs zu. Dabei wurde zunächst Vesikelflüssigkeit als Antigen benutzt (Sensitivität 95%, aber geringe Spezifität). Spezifischere Tests werden mit aufgereinigten Echinococcus multilocularis-Antigenen wie dem Em2-Antigen oder dem rekombinanten II/3-10-Antigen durchgeführt. Auf diese Art kann auch eine alveoläre von einer zystischen Echinokokkose abgegrenzt werden ³³. Die Frühdiagnostik ist in diesem Fall insofern relevant, als dass in den Frühstadien einer (ja meist über Jahre zunächst asymptomatisch verlaufenden) AE schon parasitenbedingte Organschäden vorliegen, die bei rechtzeitiger Diagnose jedoch noch operabel und damit vollständig heilbar sind.

Die Schwere des tumorähnlichen, infiltrativen und raumfordernden Wachstums hat entscheidenden Einfluss auf den klinischen Verlauf und die Prognose bei AE-Patienten. Dabei stehen im Wesentlichen die verschiedenen Komponenten des menschlichen Immunsystems und deren Interaktion mit dem Parasiten der Virulenz, Persistenz und den immunmodulatorischen Fähigkeiten des Erregers gegenüber.

1.4 Immunabwehr gegen *Echinococcus multilocularis*

Bisher ist nur wenig über die Reaktionen des menschlichen Immunsystems auf eine Infektion mit *Echinococcus multilocularis* bekannt. Bezogen auf die Immunität im Zwischenwirt (Befunde vor allem bei der Maus) scheint es eine Art Konkurrenz des Parasiten mit dem Immunsystem zu geben – oft zugunsten des Bandwurms. Das tumorartig-infiltrative Wachstum kann durch das Immunsystem nicht aufgehalten werden. Eine Immunität gegen Superinfektionen ("concomittant immunity") wird — wie bei anderen Helminthen-Infektionen bekannt — jedoch aufgebaut. Beim Menschen ließen sich spezifische Antikörper-Antworten (z.B. gegen das Em2-Antigen) nachweisen, auf denen auch serologische Tests beruhen^{34, 35}.

Eine erhöhte IgE-Produktion sowie eine Eosinophilie, die typischerweise bei Parasiteninfektionen zu finden sind, werden bei diesem Erreger nicht oder nur selten beobachtet.

Bezüglich Wahrscheinlichkeit und Ausmaß der Entstehung einer AE nach Infektion mit *Echinococcus multilocularis* herrscht von Patient zu Patient große Variabilität. Nur ca. 10% der exponierten Personen entwickeln überhaupt eine AE, während man bei immungeschwächten Patienten (AIDS) sowie bei athymischen oder SCID (severe combined immunodeficiency) Mäusen schnellere und fulminantere Verläufe der Erkrankung beobachten kann⁹. Somit wird vermutlich zumindest zu Beginn der Infektion eine gewisse Immunreaktion die Entstehung der Erkrankung verzögern oder sogar verhindern².

In der Forschungsliteratur wird die immunologische Reaktion auf einen Befall mit *Echinococcus multilocularis* im Allgemeinen als ein umfassendes Zusammenspiel zwischen sowohl humoraler als auch zellulärer Immunität, vor Allem aber auch im Sinne einer Mischreaktion aus einer Th₁- und – Th₂-Antwort dargestellt³⁶.

Die humorale Abwehr besteht aus der Bildung eines Antikörper-Musters, welches gegen verschiedene *Echinococcus multilocularis*-Antigene gerichtet ist. Hier ist wieder das kohlenhydrathaltige Molekül Em2(G11) zu erwähnen, welches in der Lamina propria (LL) zu finden ist und bei C57BL/10-Mäusen die Produktion von Antikörpern der Klasse IgG₃ induziert³⁷.

Im Falle einer Infektion können seitens der humoralen Abwehr verschiedene spezifische Immunglobuline freigesetzt werden ³⁸. In Patientenserum werden hohe Titer von parasitenspezifischem IgE und IgG₄ ^{39; 40}, außerdem auch Isotypen von IgA und IgM ⁴¹ beobachtet. Dabei ist das IgE entscheidend in granulomatöse Reaktionen in der Umgebung der Echinokokkenvesikel (periparasitäre Läsion) involviert ⁴², die vor Allem in der Frühphase einer alveolären Echinokokkose auftreten können, wenn das infiltrative Wachstum im Wirtsgewebe stattfindet ⁴³. Außerdem induziert IgE (IL-4 und IL-5-getriggert) in hohen Konzentrationen eine für zahlreiche Helmintheninfektionen (bei Mäusen und Menschen) typische Eosinophilie ⁴⁴.

An der granulomatösen Reaktion in der Umgebung der parasitären Vesikel ist im Wesentlichen die zelluläre Immunität im Sinne einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort beteiligt ^{45; 46}. Es ist nachgewiesen, dass die Zusammensetzung besagter Granulome und die relativen Anteile der T-Zell-Subpopulationen, die in den Läsionen gefunden werden, mit dem Schweregrad und dem Verlauf der Erkrankung korrelieren ⁴⁶.

Beide Wege der Immunabwehr scheinen jedoch nicht oder nicht ausreichend in der Lage zu sein, das Parasitenwachstum zu kontrollieren, sobald es zu einem Organbefall gekommen ist.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Echinococcus multilocularis gilt als einer der gefährlichsten Nematoden für den Menschen. Durch nahezu unkontrollierte Ausbreitung und tumorartiges Wachstum zerstört er unentdeckt innerhalb von Jahren das Leberparenchym und metastasenartig auch das anderer befallener Organe.

Es liegt somit nahe, dass dieser Parasit eine Überlebensstrategie entwickelt hat, die es ihm ermöglicht, der Immunantwort seines Wirts zu entgehen und/ oder sie durch Einflussnahme auf verschiedene Komponenten des Immunsystems zu seinen Gunsten zu modifizieren ².

Ich habe mich in dieser Arbeit auf die Funktion der dendritischen Zellen (DC) fokussiert, da diese als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort und als potenteste T-Zell-Stimulatoren ⁴⁷ die zentrale Rolle für ein funktionierendes Immunsystem spielen. Dabei wiederum war der Schwerpunkt meiner Arbeit die Freisetzung bestimmter Zytokine und Chemokine durch DC, da diese Vorgänge eine Schlüsselrolle bei der Initiierung einer effektiven Immunantwort im Rahmen einer Infektion spielen.

Es ergaben sich somit für mich in diesem Zusammenhang folgende Fragen:

1. Welchen Einfluss hat der Parasit auf die Zytokin- und Chemokinproduktion dendritischer Zellen?
2. Welchen Einfluss hat der Parasit auf die T-Zell-Proliferation (abhängig vom Zellstimulanz OKT3) ?
3. Wie reagieren dendritische Zellen bzgl. Wachstum, Reifung und Proliferation auf den Parasiten *Echinococcus multilocularis*?

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Biologische Materialien

2.1.1.1 Zellmaterialien

CD14⁺ Monozyten und CD14⁻ PBL:

aus 50ml Vollblut gesunder Spender, bzw. Buffy coats der Plasmafraktionierung der Blutspendezentrale der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. R. Scharf (siehe Methoden).

2.1.1.2 Echinokokkenmaterialien

Echinokokkenvesikel:

mit Echinokokkeneiern per os infizierte Mäuse werden nach mehreren Monaten hepatektomiert, die gewachsenen Metazestoden in der Leber werden in Medium kultiviert zur Gewinnung der Vesikel (s. Methoden)

Dr. Thomas Romig, Parasitologie, Universität Hohenheim

Prof. Dr. Andrew Hemphill, Parasitologie, Universität Bern

Vesikelinhalt:

Prof. Dr. Andrew Hemphill, Parasitologie, Universität Bern;

Im Weiteren eigene Herstellung (s. Methoden)

2.1.1.3 Komponenten für die cDNA-Synthese und die realtime-PCR

Im Folgenden (Tab. 1) werden die einzelnen verwendeten Primersequenzen (F=Forwardprimer, R=Reverseprimer) und ihre dazu gehörigen Sonden (Fa. Roche Universal ProbeLibrary Set, Human) tabellarisch aufgeführt:

Primer	Sequenz (5' → 3')	Sonde (#)
IL-1 β	F: - CTG TCC TGC GTG TTG AAA GA - R: - TTG GGT AAT TTT TGG GAT CTA CA -	78
IL-12	F: - CCC TGA CAT TCT GCG TTC - R: - AGG TCT TGT CCG TGA AGA CTC TA -	37
CXCL1	F: - TCC TGC ATC CCC CAT AGT TA - R: - CTT CAG GAA CAG CCA CCA GT -	52
CXCL10	F: - GAA AGC AGT TAG CAA GGA AAT GT - R: - GAC ATA TAC TCC ATG TAG GGA AGT GA -	34
β -Aktin	F: - CCA ACC GCG AGA AGA TGA - R: - TCC ATC ACG ATG CCA GTG -	64

Tabelle 1: verwendete Primersequenzen (F=Forwardprimer, R=Reverseprimer) und ihre dazu gehörigen Sonden

Desweiteren wurden benötigt:

DTT	InVitroGen (D-Karlsruhe)
RNAse Out	InVitroGen (D-Karlsruhe)
MMLV-Reverse Transkriptase	InVitroGen (D-Karlsruhe)
qPCR TM Mastermix – No ROX	Eurogentec (D-Köln)

2.1.1.4 Medienkomponenten und Zytokine

AB-Serum	BioWhittaker/Cambrex (Walkersville, USA)
BSA	SAFC Biosciences (Hampshire, UK)
FCS (Fetal Calf Serum)	Gibco, Invitrogen (D-Karlsruhe)
GM-CSF (Granulocyten-Makrophagen-	Sagramostim, Berlex (New

Colony-Stimulating-Factor)	Jersey, USA)
Heparin	Heparin-Natrium, 25000 I.E., Ratiopharm (D-Ulm)
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's media)	Bio Whittaker, Cambrex (Walkersville, USA)
IL-4 (Interleukin-4)	PeptoTech/ Tebu (D-Offenbach)
LPS	Sigma (D-Taufkirchen)
Kaninchenserum	Bio Whittaker, Cambrex (Walkersville, USA)
OKT3	American Type Culture Collection (Rockville, USA)
Penicillin/Streptomycin	Sigma (D-Taufkirchen)
PMA	Sigma (D-Taufkirchen)

2.1.1.5 Lösungen und Puffer

Zur Kultivierung der dendritischen Zellen:

Medium IMDM, 10% FCS

Zur Kultivierung der Echinokokkenvesikel:

Medium IMDM, 10% FCS, 3% Penicillin/Streptomycin

Zur Aufreinigung mononukleärer Zellen:

Ficoll-Hypaque Amersham Biosciences, GE Healthcare Europe GmbH (D-München)

MACS Puffer PBS, 2mM EDTA, 2% AB-Serum

PBS pH 7,3 Gibco, Invitrogen (D-Karlsruhe)

Trypanblau 0,4% Sigma (D-Taufkirchen)

Zur Vorbereitung der Zellen für FACS-Analyse:

FACS-Puffer PBS, 5% FCS, 0.1 % Natrium-Azid

Zur RNA-Aufreinigung dendritischer Zellen:

UltraPure™ Distilled Water,

DNase- und RNase-frei

Gibco, InvitroGen (D-Karlsruhe)

Zur cDNA-Synthese:

fünffacher Transkriptionspuffer

InVitroGen (D-Karlsruhe)

2.1.1.6 Antikörper

anti-human CD83 (PE)

BD Biosciences Pharmingen (D-Heidelberg)

anti-human CD40 (PE)

BD Biosciences Pharmingen

anti-human CD11b (PE)

BD Biosciences Pharmingen

anti-human HLA-DR (FITC)

BD Biosciences Pharmingen

anti-human CD86 (FITC)

Serotec (D-Düsseldorf)

anti-human CD14 MACS Microbeads

Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch-Gladbach)

2.1.2 Sonstige Materialien

2.1.2.1 Laborgeräte

CO₂-Brutschrank

Heraeus (D-Langensfeld)

Counter

120S Betaplate, Perkin Elmer, Wallac GmbH (D-Freiburg)

FACS-Calibur

BD, Becton Dickinson (D-Heidelberg)

Harvester

Skatron, Basic 96, Zinsser Analytic GmbH (D-Frankfurt)

Heat Sealer und Light Box

Wallac GmbH (D-Freiburg)

Mikroskope

Carl Zeiss MicroImaging GmbH, (D-Köln)

PH-Meter

Mettler Toledo (D-Giessen)

Photometer

Tecan GmbH (D-Crailsheim)

realtime-PCR	iCycler IQS, BioRad (D-München)
Sample Bagging Support	Wallac GmbH (D-Freiburg)
Sterilbank	Gelaire (Sydney, Australien)
Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (D- Schwalbach)
Wasserbad	Köttermann Labortechnik (D-Uetze)
Zentrifuge	Rotanta 46 RC, Hettich Zentrifugen (D-Tuttlingen)

2.1.2.2 Verbrauchsmittel

Cryotubes (1,8ml)	Nunc (D-Wiesbaden)
Dispensertips	Brand (D-Wertheim)
Domed Caps	Eurogentec (D-Köln)
FACS-Röhrchen	BD, Becton Dickinson (D-Heidelberg)
Falcon-Tubes (50ml, 15ml)	BD, Becton Dickinson (D-Heidelberg)
NuncMaxisorb 96-well-Platten	Nunc (D-Wiesbaden)
PCR-96-Well-Platten	Eurogentec (D-Köln)
Pipettenspitzen	Starlab (D-Ahrensburg)
Sterile 96-well-Platten	Costar, Sigma (D-Taufkirchen)
Zellkulturflaschen, 75cm ²	Costar, Sigma (D-Taufkirchen)

2.1.2.3 Chemikalien

3-Morpholinopropansulfursäure (MOPS)	Fluka
Chloroform	Merck (D-Darmstadt)
DEPC-Wasser	Sigma (D-Taufkirchen)
Ethanol	Roth (D-Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Sigma (D-Taufkirchen)
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare Europe GmbH (München)
Isopropanol	Merck (D-Darmstadt)
Trizol (TriReagent)	Sigma (D-Taufkirchen)

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung der Echinokokken-Vesikelflüssigkeit (Em-VF)

Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) (Gerbils) werden durch eine intraperitoneale Injektion von aufgereinigten Echinokokkenvesikeln mit dem Erreger infiziert. Nach zwei bis drei Monaten sind in der Regel erste Zysten in der Bauchhöhle von außen tastbar. Nach dem Auftreten dieser Zysten werden die Gerbils durch HWS-Fraktur getötet, das Abdomen chirurgisch eröffnet und die gewachsenen Vesikel aus dem Peritoneum entfernt. Dies wurde von einer MTA des Instituts durchgeführt. Generell wurden alle Experimente mit Gerbils mit einer Genehmigung der Bezirksregierung und nach den internationalen Tierversuchsregelungen durchgeführt (Ethikvotum vom 18.09.2012: Studiennr.: 3967, Tierversuchsgenehmigung v. 18.04.2006, Referenznr.: 50.05-240-29/06). Die Vesikel wurden anschließend in IMDM + 10% FCS + Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Die Bildung der Echinokokkenvesikel dauert bis zu sechs Monate, diese sind dann frei in der Mediumflüssigkeit zu finden. Danach können die Vesikel aufgeschnitten, der Inhalt zentrifugiert (650g, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand bis zu seinem experimentellen Gebrauch bei -20°C gelagert werden. Der Proteininhalt wurde mittels der Bradford-Probe (s.u.) gemessen.

2.2.2 Methoden der Zellkultur

2.2.2.1 Präparation und Isolation von Dendritischen Zellen (DC) und peripheren mononukleären Blutlymphozyten (PBL) aus Humanblut

Für die Experimente wurde humanes, tagesfrisches, Buffy Coat-Blut gesunder Spender aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Das Blut wurde zunächst in sterilen 50ml-Falcon-Röhrchen mit PBS gewaschen (Volumenverhältnis Blut/PBS=0,5). Im Anschluss daran wurde zur Gewinnung einer separierten Leukozyten-Interphase ein Ficoll-Dichtegradient angefertigt. Nach Zentrifugation des Dichtegradienten (1150xg, 30min, 25°C) wurde die Leukozyten-Interphase (sichtbar als weiße Intermediärschicht) abgenommen, mit PBS+0,5% Heparin in Verhältnis 1:1

gewaschen, zentrifugiert (650xg, 10min, 6°C) und der Überstand verworfen. Dieser Schritt erfolgte ein weiteres Mal. Die Separierung der CD14-positiven Zellen erfolgte mittels eines Magnetic Cell Sorting (MACS) mit Anti-CD14-Antikörpern. Nachdem das Leukozytenpellet in MACS-Puffer (=PBS+2mM EDTA+0,5% AB-Serum) resuspendiert und 15 Minuten lang zusammen mit den CD14-Antikörpern (Volumenverhältnis Antikörper/Zellsuspension=0,33) bei 4°C inkubiert worden ist, wurden die Zellen in MACS-Puffer resuspendiert, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte die Trennung CD14-negativen und -positiven Zellen in der MACS-Säule. Die CD14-negativen Zellen (größtenteils PBLs) konnten nach einem weiteren Zentrifugationsvorgang (650xg, 10 Min.) für die Versuche verwendet werden, des weiteren Procedere bezüglich der CD14-positiven Zellen wird im Folgenden beschrieben.

Nach Abzentrifugieren und Zählung der CD14-positiven Zellen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (400x) über eine 1:10-Verdünnung mit Trypanblau. Anschließend wurden die CD14-positiven Zellen in Zellkulturflaschen eine Woche lang bei 37°C und 10% CO₂ angereicherte Raumluft inkubiert. Dem Medium (IMDM + 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum=FCS + 2% Glutamin) wurde zur Zellstimulation GM-CSF (5mg/ml) und IL-4 (5 x 10⁴U/ml) hinzugefügt, damit sich aus den CD14-positiven Monozyten Dendritische Zellen entwickeln. Die Hälfte des Mediums und besagte Zytokine mussten alle 48 Stunden erneuert werden. Nach 7 bis 8 Tagen standen die uDCs für die Versuche zur Verfügung.

Für T-Zell-Proliferations-Experimente, die keine DCs benötigten, wurden die PBLs aus frisch abgenommenem Blut nicht-infizierter, freiwilliger Probanden durch Verdünnen mit PBS, einen Ficoll-Dichtegradienten (s.o.) und drei weiteren Zentrifugationsvorgängen (650xg, 430xg und 310xg) mit jeweils anschließendem Verwerfen des Überstandes und Resuspendieren der Zellen im Medium gewonnen.

2.2.2.2 Fluoreszenzaktivierte Zell-Scan-Analyse (FACS) zur Charakterisierung Dendritischer Zellen

Zur Feststellung des Differenzierungsstatus und Erfassung der Güte der durch die Zellpräparation gewonnenen dendritischen Zellen werden diese mit monoklonalen Antikörpern gegen extrazelluläre Oberflächenbestandteile markiert. Die Antikörper sind an fluoreszierende Moleküle (Fluoreszein/ FITC oder Phycoerythrin/ PE) gekoppelt, so dass Antikörper-markierte Oberflächenstrukturen optisch sichtbar gemacht und mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantitativ erfasst werden können. Hierfür sind mindestens 600.000 Zellen nötig ². Zunächst werden die Fc-Rezeptoren der Zellen mit Kaninchenserum (500µl pro 10⁶ Zellen) über 20 Minuten bei 4°C geblockt. Dies dient dazu, eine unspezifische Bindung der Antikörper durch die Zellen zu verhindern. Die Zellen werden im Anschluss auf FACS-Röhrchen verteilt, mit FACS-Puffer (2ml pro Röhrchen) gewaschen und 10 Minuten lang zentrifugiert (650xg, 4°C). Anschließend werden die Zellen mit den jeweiligen Antikörpern in Lösung gebracht und im Dunkeln bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper werden die Zellen zwei weitere Male mit PBS gewaschen. Als Negativkontrolle und zur Kalibrierung des FACS-Geräts werden einige Zellen mit unspezifischem IgG1-PE und IgG2a-FITC doppelgefärbt. Es folgen zwei weitere Waschvorgänge (640g, 10 Minuten, 4°C). Die Zellen werden in 300 bis 500µl FACS-Puffer aufgenommen, so dass die Messung nun stattfinden kann ².

2.2.2.3 Stimulation und Inkubation der DCs zur Chemokinmessung

Nach einer Woche Inkubation werden die uDC gewaschen, gezählt und folgendermaßen in einer 24-Well-Flachbodenplatte (Volumen pro Well: 300µl) stimuliert:

- uDC + 100ng/ml LPS
- uDC + 100ng/ml LPS + 50µg/ml VF
- uDC + 4ng/ml PMA
- uDC + 4ng/ml PMA + 50µg/ml VF
- uDC + Medium
- uDC + Medium + 50µg/ml VF.

Die uDC-Zahl pro Well beträgt 1.000.000. Es wurden immer Doppelwerte verwendet. Die Zellen werden 12-18 Stunden (37°C, 10% CO₂) inkubiert.

2.2.3 Messung der T-Zell-Proliferation (T-Zell-Proliferations-Assay)

Isolierte periphere Blutlymphozyten (PBLs) aus dem Blut nichtinfizierter Probanden wurden in Medium (IMDM + 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum=FCS + 2% Glutamin) resuspendiert. Die Zellen wurden kultiviert in 96-Well-Rundbodenplatten über 72, 96 oder auch 120 Stunden. Die Zellzahl betrug $1,5 \times 10^5$ pro Well. Die Stimulation erfolgte mit OKT3, welches einem Hybridomüberstand entnommen worden war und 1:3000 verdünnt worden ist. Die Stimulation wurde wahlweise mit und ohne Zugabe von 25µg/ml VF durchgeführt. Zur Negativkontrolle dienten unstimulierte PBLs. Die Zellen wurden über 48 Stunden (37°C, 10% CO₂) inkubiert.

Alle Tests wurden dreifach durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 10µl/Well ³H-Thymidin (0,2µCi) gepulst und nach 24 Stunden erneuter Inkubation (37°C, 10% CO₂) bei -20 °C eingefroren. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Platten aufgetaut und die Wells mit dem Harvester geerntet. Die ³H-Thymidin-Inkorporation wurde mit dem β-Counter gemessen.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 RNA-Isolierung aus uDC

Die uDC werden einmalig mit PBS gewaschen. 5-10 Mio. Zellen werden mit 1 ml Trizol, anschließend in 200µl Chloroform lysiert und dann zentrifugiert. Der Oberphase wird 500µl Isopropanol hinzugegeben, danach erneut inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wird mit 75% Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in DEPC-Wasser bei 56°C gelöst. Die RNA-Messung erfolgt photometrisch bei 260nm.

2.2.4.2 cDNA-Synthese mit RT-PCR

In der RT-PCR wird die gewonnene RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) und oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese werden jeweils 1 bis 2 µg zuvor gewonnene RNA in 10µl DEPC-Wasser eingesetzt. Nach Zugabe des oligo-dT-Primers (0,5µg/ml) wird die RNA zwei Minuten lang bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wird ein Master-Mix hinzugegeben, pro Probe jeweils bestehend aus:

- 1 µl 10 mM dNTPs, 4µl fünffacher Transkriptionspuffer
- 2 µl 0,1M DTT
- 1 µl 40 U/µL RNase out
- 1 µl 200 U/µl MMLV-Reverse Transkriptase (InVitroGen), ein RT-Enzym aus dem Moloney-Murine-Leucaemia-Virus.

Die cDNA-Synthese erfolgt eine Stunde lang bei 37°C, im Anschluss werden die Enzyme bei 95°C inaktiviert, die Proben auf 100µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt und bei -21 °C bis zur Benötigung zur realtime-PCR eingefroren.

2.2.4.3 Chemokin-realtime-PCR

Jede verwendete cDNA-Probe wurde vor Verwendung auf das Verhältnis 1:10 in UltraPure™ (destilliertes Wasser) verdünnt.

Zunächst erfolgte der Mix des benötigten PCR-Reagens. Das aus sechs Teilen bestehende PCR-Reagens wurde immer in einem Reinraum, das heißt unter DNA- und DNase-freien Bedingungen angesetzt. Das PCR-Reagens setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 12,5 µl DNA MasterMix (Eurogentec qPCR™ Mastermix – No ROX)
- 6,5 µl Wasser (Aqua ad injectabilium)
- 0,25µl DNA-Sonde (Roche)
- 0,25µl Vorwärtsprimer (Roche)
- 0,25µl Rückwärtsprimer (Roche).

Bei der Auswahl der korrekten Sonden ist darauf zu achten, dass ausschließlich intronumspannende Sequenzen verwendet werden, um die Detektion von unerwünschter genomischer DNA (in Form von Kontaminationen der cDNA-Probe) auszuschließen.

Die 20µl PCR-Reagens werden jeweils in die gewünschten Wells pipettiert. Im Anschluss daran wurden jeweils 5µl der cDNA-Probe hinzu gegeben und die Wellinhalte zentrifugiert (Quick-Run-Verfahren, bis zu 360xg).

Die bei Raumtemperatur aufgetauten und die im Verhältnis von 1:10 verdünnten cDNA-Proben wurden wiederum im Verhältnis 1:5 (also 5 µl cDNA-Probe + 20 µl PCR-Reagens pro Well) in Tripletbestimmungen auf eine 96-Well-PCR-Platte aufgetragen. Die Wells wurden mit den dazu gehörigen Caps verschlossen. Es folgte die realtime-PCR.

Aufgrund des Analyseverfahrens der realtime-PCR lagen nun bekanntermaßen sigmoidale Kurvenverläufe vor, anhand derer sich, abhängig von der jeweiligen Probe, die CT-Werte bestimmen ließen. Das bedeutet, dass auf der y-Achse ein Fixpunkt bestimmt wurde, durch den eine Gerade parallel zur X-Achse verläuft. Der CT-Wert definiert sich als der Schnittpunkt dieser Geraden mit der entstandenen sigmoidalen Kurve und liegt optimalerweise im unteren Scheitelpunkt, also im ersten Anstiegspunkt der Kurve. Der CT-Wert ist somit die Zykluszahl, zu der die Kurve steil anzusteigen beginnt, am Beginn des logarithmischen Teil der Kurve. Je geringer die Ausgangskonzentration an cDNA ist, desto höher ist die Zykluszahl, in dem der logarithmische Teil der Kurve beginnt. Folglich liefert der CT-Wert eine Aussage über die Menge der freigesetzten Nukleotide, die gemessen worden sind. Je höher die Zykluszahl, umso weniger zu messendes Material liegt vor. Die Menge der von der Zelle generierten RNA ist folglich umgekehrt proportional zur Zykluszahl und damit zum Zeitpunkt des Anstiegs der Kurve in der realtime-PCR. Hieraus lassen sich entscheidende Informationen über die Quantität der Expression ableiten. Die Expression, relativ zu einem nicht durch Stimulation beeinflussten Gen (β -Aktin), wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{relative Expression} = 2^{\text{CT}(\beta\text{-Aktin}) - \text{CT}(\text{Probe})} \times 10.000 \quad .$$

Der Faktor 10.000 dient lediglich als Verstärkungsfaktor zur besseren Darstellung der Ergebnisse.

Um ein einheitliches Bild über die Zahlenwerte zu erhalten, wurde für jedes Diagramm ein Referenzwert auf 1 normiert. Dies war, soweit messbar, der Wert

der Mediumkontrolle. Folglich wurden die Messwerte durch den Wert der Mediumkontrolle dividiert.

Die Error Bars geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der jeweiligen Vierfachbestimmung an.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode dient der quantitativen Erfassung des Proteingehalts der Vesikelflüssigkeit. Ein Standard (zum Beispiel 2 mg/ml BSA) wird 1:10 in PBS verdünnt und in neun Konzentrationen von 100 – 200 µg/ml angesetzt. Von jeder Konzentration werden je 100 µl in eine Mikroplatte überführt. Es wird von jeder Verdünnung eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die zu bestimmende Probe wird als Doppelbestimmung in einer Reihe jeweils 1:5 mit PBS verdünnt, bis wieder neun Verdünnungsstufen vorliegen. Nach dem Auspipettieren der Probe und des Standards werden in einem Röhrchen 3ml der Proteinreagenzstammlösung (100 mg Coomassie Blue G, 50 ml Ethanol 96%, 100 ml Phosphorsäure 85%) mit 17 ml Aqua dest. vermischt und pro Well 20µl blasenfrei auf die Platte transferiert. Dabei entsteht eine bläuliche Färbung. Im Photometer wird im Anschluss die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 496 nm gemessen. Mittels der Standardkurve lässt sich die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe ermitteln.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Proteingehaltes der VF mit der Bradford-Probe

Die für diese Arbeit benötigten Echinokokkenantigene lagen ausschließlich in Form der *Echinococcus multilocularis*-Vesikelflüssigkeit (Em-VF) vor. Zur besseren Quantifizierung der einzelnen Bestandteile dieser Flüssigkeit und zur Gewährleistung einer Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Proben wurde der Proteingehalt mit Hilfe der Bradford-Probe bestimmt.

Nach mehreren eigenen Vorexperimenten und basierend auf der Arbeit von Dr. med. N. Voigt aus dem Jahre 2009 (Institut für med. Mikrobiologie, Düsseldorf) wurde eine VF-Proteinkonzentration von 25 µg/ml verwendet, da diese zu validen und vergleichbaren Ergebnissen geführt hat. Für die Stimulation der DCs zur Erstellung des Chemokin-Profiles (s. Methoden) hat in Einzelfällen auch eine Konzentration von 50 µg/ml zu deutlicheren Ergebnissen geführt. Um Vergleichbarkeit mit o. g. Arbeit zu erhalten und nicht zuletzt auch bei phasenweise wenig Experimentiermaterial wurde dennoch häufig die VF-Proteinkonzentration von 25 µg/ml verwendet.

3.2 Differenzierung dendritischer Zellen aus CD14+ Monozyten

Der Nachweis einer Differenzierung zu dendritischen Zellen gelingt lichtmikroskopisch. Nach einigen Tagen verändern die Immunzellen ihre Morphologie: Sie werden größer und bilden zahlreiche fingerförmige Ausläufer aus, die Dendriten. Diese Methode unterliegt jedoch in gewissem Grad der Subjektivität des Betrachters. Eine objektive Methode zur Erfassung des Differenzierungsstatus der Zellen bietet die oben beschriebene und unten beispielhaft dargestellte FACS-Analyse. In erster Linie soll im folgenden Bild (Abb. 4, S. 26) dargestellt werden, dass reife DCs kostimulatorische Marker wie z. B. HLADR und CD 86 exprimieren, was bei uDCs nicht der Fall ist.

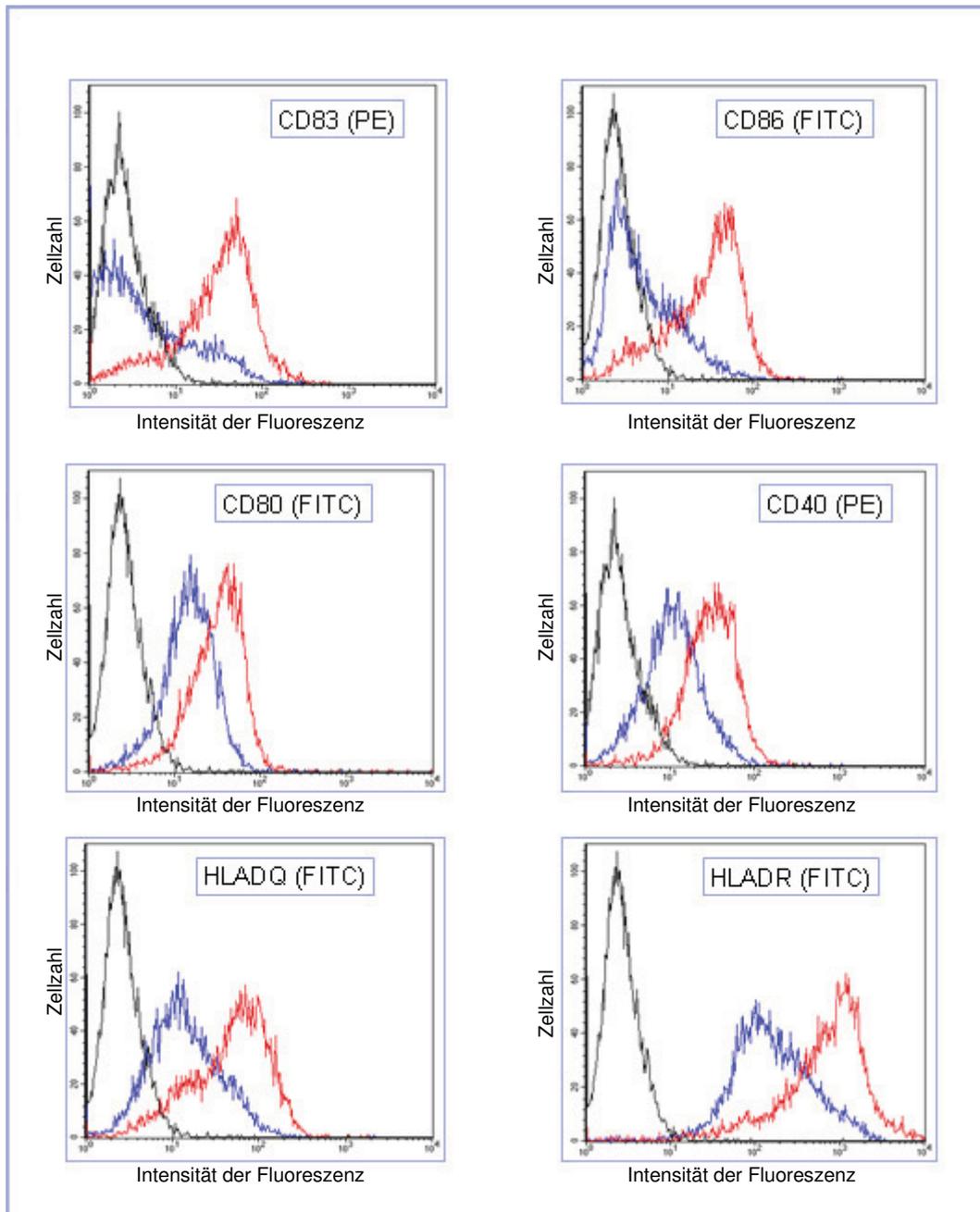


Abb. 4: Differenzierung reifer (rote Markierung) und unreifer (blaue Markierung) dendritischer Zellen anhand von spezifischen Oberflächenmarkern, dargestellt mittels FACS-Kontrolle 10 Tage alter, ex-vivo differenzierter DC. Nach insgesamt 10 Tagen Stimulation mit GM-CSF und IL-4 wurden DC mit inflammatorischen Zytokinen zur Reifung stimuliert oder nur mit GM-CSF und IL-4 weiter inkubiert über weitere drei Tage. 100.000 Zellen wurden mit FITC-markierten bzw. PE-Markierten Antikörpern inkubiert und in FACS analysiert. Die Isotyp-Kontrolle ist in schwarz angezeigt.

3.3 Einfluss von VF auf die T-Zell-Rezeptor-abhängige T-Zell-Proliferation

Werden T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor (CD3) stimuliert, resultiert daraus bekannterweise eine T-Zell-Proliferation. Um herauszufinden, ob und inwiefern diese T-Zell-Rezeptor-abhängige T-Zell-Proliferation durch die Anwesenheit von Echinokokken-VF beeinflusst wird und darüber eventuell immunmodulatorische Effekte erfolgen, wurden T-Zellen mit OKT3, jeweils mit und ohne VF inkubiert und stimuliert. OKT3 ist ein muriner monoklonaler Antikörper gegen den CD3 auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten und führt kurzfristig zu einer massiven Aktivierung der Zellen und einer Stimulation der T-Zell-Proliferation.

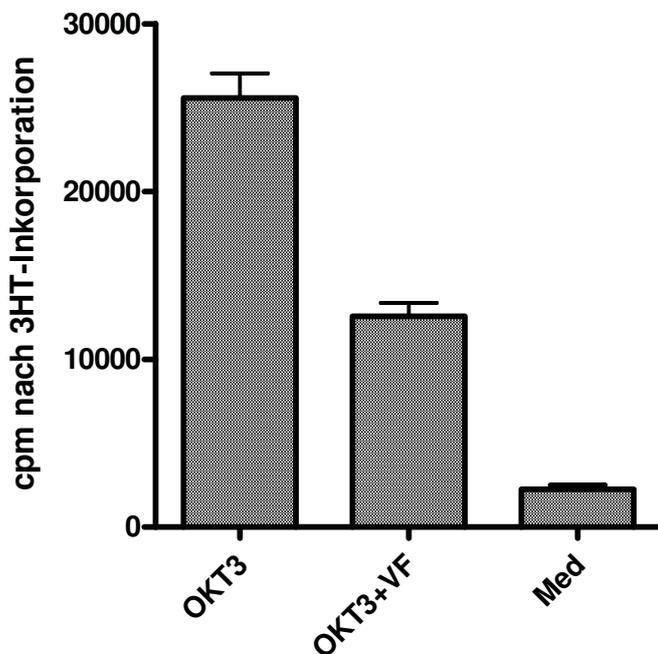


Abb. 5: Einfluss von VF auf die T-Zell-Rezeptor-abhängige T-Zell-Proliferation in vitro.

150.000 T-Zellen pro Well wurden für die ersten 2 Stunden teils in Medium belassen, teils mit VF koinkubiert. Anschließend wurden beide Versuchsreihen 48 Stunden lang mit OKT3 (1:30000) koinkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit ^3H T gepulst. Nach 24 Stunden wurden die Proliferationswerte mit einem Counter gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung. Dieser Versuch war repräsentativ für acht voneinander unabhängige Experimente. Die Error Bars geben die Standardabweichung an.

Offenbar ist die Em-VF in der Lage, die OKT3-stimulierte T-Zell-Proliferation auf ca. 60% der gemessenen Proliferationsraten zu inhibieren. Da die OKT3-abhängige Proliferation von T-Zellen über membranständige Rezeptoren auf den

T-Zellen gesteuert und reguliert wird, scheinen die Bestandteile der Em-VF diesen Weg der Signaltransduktion zumindest partiell zu blockieren. Dies könnte somit einen immunmodulatorischen Effekt der Em-VF auf die T-Zell-Abwehr darstellen, der trotz massiver Stimulation des T-Zell-Rezeptors - hier unter OKT3 - auftritt.

3.4 Einfluss von VF auf die IL-1-Expression aus stimulierten uDCs

Da Echinokokken-VF offensichtlich die T-Zell-Rezeptor-vermittelte Stimulation von T-Zellen hemmen kann, wäre es interessant zu sehen, ob andere Moleküle und auch Antworten ebenso durch die Anwesenheit der Em-VF beeinflusst werden. Dahingehend soll nun dargestellt werden, ob die Em-VF die LPS-induzierte IL-1-Produktion durch uDC zu modulieren vermag, bzw. ob und wie sich die VF auf die Expression von IL-1 durch unstimulierte uDCs und durch uDCs auswirkt, die zuvor mit PMA stimuliert wurden. PMA wurde als Stellvertreter eines intrazellulären Zellstimulans gewählt, im Gegensatz zu LPS, welches Signale ausschließlich über membranständige Zellrezeptoren übermittelt. Somit soll durch Hinzuziehen von PMA geklärt werden, ob Hemmungsmechanismen der intrazellulären Signalgebung durch die VF induziert werden.

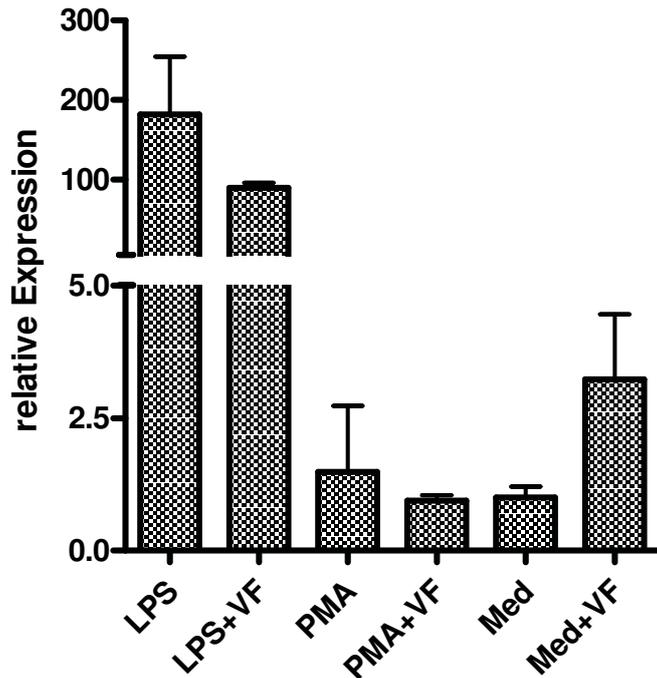


Abb. 6: Einfluss von VF auf die IL-1-Expression stimulierter uDCs.

uDCs wurden 16 Stunden in Medium mit oder ohne LPS oder PMA, jeweils mit oder ohne VF inkubiert. Anschließend wurde die Expression von IL-1 (wie im Methoden-Teil beschrieben) gemessen. Die Daten zeigen die Werte der RNA-Expression von stimulierten uDC, repräsentativ für 3 unabhängige Experimente, normiert auf den Wert der Mediumkontrolle (gesetzt als 1). Die Error Bars geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der Vierfachbestimmung an.

Unstimulierte uDCs lassen sich durch die VF zu einer schwachen IL-1 Produktion anregen. Dies zeigt sich in einer >2,5 fachen Steigerung der IL-1-Produktion durch uDCs in Gegenwart von VF. Zuvor wurde kontrolliert und verifiziert, dass die Em-VF frei von LPS war.

LPS induziert bekanntermaßen eine starke IL-1-Produktion. IL-1 wird nicht nur von Monozyten oder Makrophagen sezerniert, sondern auch von uDC, was sich in dem Versuch im Sinne einer Steigerung auf das 200-fache der Medium-Werte zeigen ließ. Auf diese LPS-induzierte IL-1-Produktion hat die VF offenbar einen hemmenden Einfluss. So wird von LPS-stimulierten uDCs unter der Anwesenheit von Echinokokken-VF um rund die Hälfte weniger IL-1 sezerniert als unter Mediumbedingungen.

PMA scheint sich hier nicht auf die IL-1 Produktion von uDCs auszuwirken. Ebenso ließ sich kein Hinweis auf einen Einfluss durch VF auf die IL-1-Expression von PMA-stimulierten DCs nachweisen.

3.5 Einfluss von VF auf die IL-12-Expression stimulierter uDCs

Da auch IL-12 als weiterer Vertreter der proinflammatorischen Zytokine bei akuten und chronischen Entzündungsvorgängen eine wichtige Rolle spielt, ist es hier interessant, herauszufinden, ob die IL-12-Freisetzung durch uDC, die entweder unstimuliert gelassen oder mit LPS oder PMA stimuliert worden sind, mittels der VF in irgendeiner Weise beeinflusst wird.

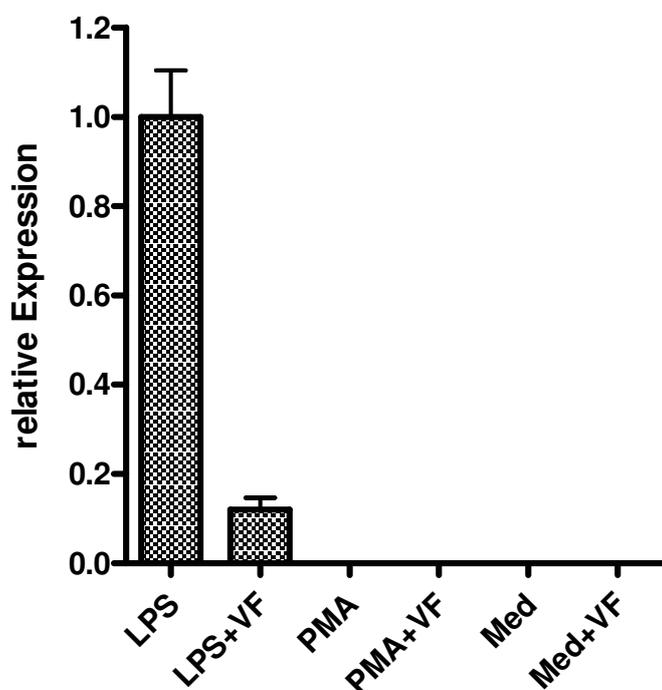


Abb. 7: IL-12-Expression stimulierter uDCs.

uDCs wurden 16 Stunden, mit oder ohne LPS oder PMA, stimuliert, jeweils mit oder ohne VF. Anschließend wurde die RNA gewonnen und die Expression von IL-12 gemessen. Die Daten zeigen die Werte der RNA-Expression stimulierter uDC, repräsentativ für 4 unabhängige Experimente, normiert auf den Wert der LPS-Stimulation (LPS=1). Die Error Bars geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der Vierfachbestimmung an.

Offenbar hemmt die VF die LPS-induzierte IL-12-Produktion und reduziert damit die IL-12-Produktion signifikant um ca. 80%. Dieses Ergebnis bestätigte sich in einer vierfachen Wiederholung des Versuches mit unterschiedlichen Blutproben.

Somit scheinen die VF oder zumindest bestimmte Bestandteile eine entzündliche Antwort, wie beispielhaft in Form des in vitro-Modells mit uDCs dargestellt, über eine IL-12-Hemmung zumindest teilweise unterbinden zu können. Dies könnte einer der immunologischen Escape-Mechanismen der Echinokokken sein, da in diesem Fall ja der Frühphase der inflammatorischen, antiparasitären TH1-Reaktion entgegengewirkt wird. Die fehlende Stimulation durch PMA lässt sich in diesem Fall nicht kausal erklären und ist als Ausschlussdiagnose auf einen Materialfehler des PMA zurückzuführen.

3.6 Einfluss von VF auf die CXCL1-Expression aus stimulierten uDCs

Der proinflammatorisch wirksame Botenstoff CXCL1 aus der Familie der CXC-Chemokine wird hier exemplarisch auf seine Expression durch uDCs, die entweder keiner oder einer Stimulation durch LPS oder PMA, jeweils mit oder ohne Echinokokken-VF, ausgesetzt sind, untersucht.

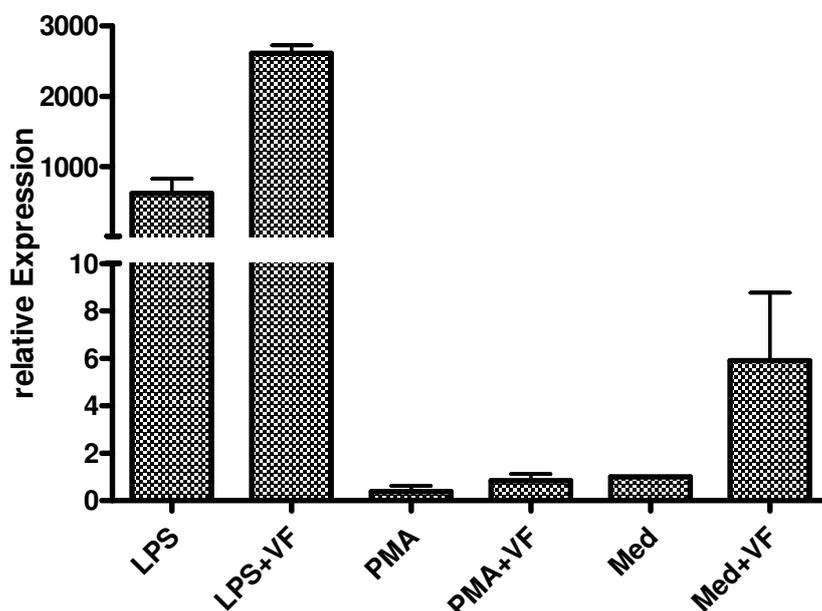


Abb. 8: CXCL1-Expression in stimulierten uDCs.

uDCs wurden 16 Stunden inkubiert mit LPS oder PMA, jeweils mit oder ohne VF. Anschließend wurde die RNA aufgereinigt und die Expression von CXCL1 gemessen. Die Daten zeigen die Werte der RNA-Expression von stimulierten uDC, repräsentativ für 4 unabhängige Experimente, normiert auf den Wert der Mediumkontrolle (Med=1). Die Error Bars geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der Vierfachbestimmung an.

Die Basis-Expression von CXCL1 in uDC wird durch Inkubation in Medium dargestellt. Eine gleichzeitige Inkubation der uDC mit VF steigert die Expression um den Faktor 5. Somit ist die VF offensichtlich, im Vergleich zu LPS, ein schwacher Stimulus zur CXCL1-Produktion, denn eine Stimulierung der uDC mit LPS induziert eine CXCL1-Expression, die das 800-fache der Basiswerte beträgt. Die gleichzeitige Stimulierung mit LPS und VF steigert die CXCL1-Expression zusätzlich um den Faktor 3 auf den fast 3000-fachen Wert der Basis-Expression, so dass die VF auf die CXCL1-Expression durch LPS-stimulierte uDCs eine zusätzlich verstärkende Wirkung aufzuweisen scheint. Im Vergleich dazu führt die Stimulierung durch PMA zu keiner nennenswerten CXCL1-Expression; sie ist im Vergleich zu den Basiswerten nicht signifikant.

3.7 Einfluss von VF auf die CXCL10-Expression aus stimulierten uDCs

Dieses besonders die zellvermittelte Immunabwehr (die ja in der Frühphase der alveolären Echinokokkose eine wichtige Rolle spielt) fördernde, proinflammatorische Chemokin wird untersucht auf seine Expression durch uDCs, die entweder keiner oder einer Stimulation durch LPS oder PMA, jeweils mit oder ohne Echinokokken-VF, ausgesetzt sind.

Die Basis-Expression von CXCL10 in uDC wird durch Inkubation in Medium dargestellt. In Abb. 3.8 fällt es auf, dass eine gleichzeitige Inkubation der uDC mit VF die Expression von CXCL10 nicht steigert, die VF damit per se keinen Stimulus zu einer vermehrten CXCL10-Sekretion für die uDCs darstellt. Auf die CXCL10-Expression in uDCs in Medium hat die VF diesen Versuchen zufolge keinen Einfluss. Eine Stimulierung der uDC mit LPS induziert hingegen eine verstärkte CXCL10-Expression auf das 160-fache der Basiswerte (also uDC in Medium). Die gleichzeitige Stimulierung mit LPS und VF hemmt jedoch wiederum die durch LPS getriggerte CXCL1-Expression und reduziert damit die CXCL10-Produktion signifikant um ca. 90%. Dieses Ergebnis ließ sich in einer vierfachen Wiederholung des Versuches mit unterschiedlichen Blutproben bestätigen.

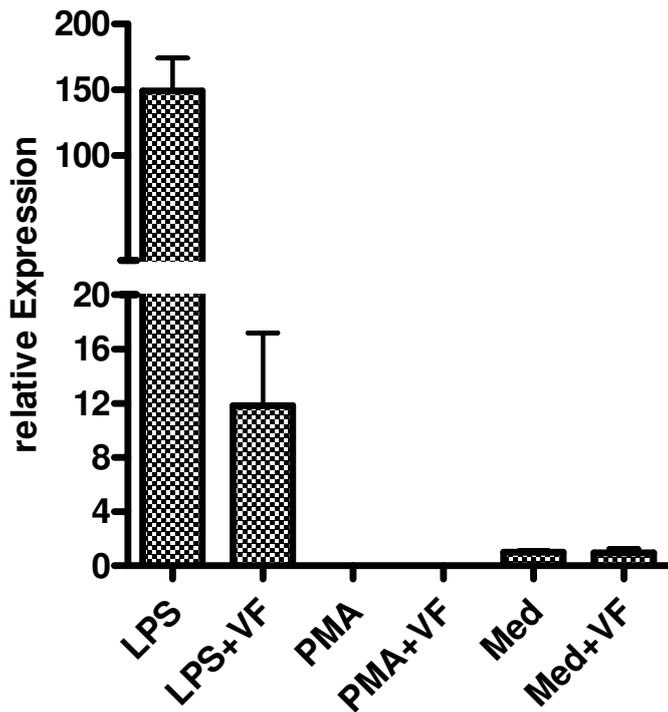


Abb. 9: CXCL10-Expression stimulierter uDCs.

uDCs wurden 16 Stunden mit LPS, PMA und in Medium inkubiert, jeweils zusammen mit bzw. ohne VF. Anschließend wurde die RNA aufgereinigt und in cDNA revers transkribiert. Mit einer realtime-PCR wurde die Expression von CXCL10 gemessen. Die Daten zeigen die Werte der RNA-Expression von stimulierten uDC, repräsentativ für 4 unabhängige Experimente, normiert auf die Mediumwerte. Die Error Bars geben die Standardabweichungen vom Mittelwert der Vierfachbestimmung an.

Somit scheinen die VF oder bestimmte Bestandteile dieser durch eine CXCL10-Hemmung eine entzündliche Antwort, wie sie hier beispielhaft in Form des in vitro-Modells mit uDCs dargestellt wird, zumindest teilweise unterbinden zu können. Dies könnte einer der Hemmungsmechanismen der Echinokokken auf die zelluläre Immunantwort sein, da hier ja der Frühphase der inflammatorischen, antiparasitären Th₁-Reaktion entgegengewirkt wird. Es ist jedoch anzumerken, dass sich weiterhin, auch unter der Hemmung durch die VF, eine durch LPS verstärkte CXCL10-Expression nachweisen ließ, die nach wie vor das 10-fache des Basiswertes beträgt.

Die Stimulierung durch PMA führte zu keiner nennenswerten CXCL10-Expression.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Echinokokkenvesikelflüssigkeit hat einen Effekt auf die OKT3-induzierte Proliferation von T-Zellen. Dieser Effekt ließ sich durch eine Hemmung der OKT3-stimulierten T-Zell-Proliferation durch die VF auf ca. 60% der im Medium-Vergleich gemessenen Proliferationsraten nachweisen. Da die OKT3-abhängige Proliferation von T-Zellen über membranständige Rezeptoren auf den T-Zellen gesteuert und reguliert wird, scheinen die Bestandteile der VF diesen Weg der Signaltransduktion zumindest partiell zu blockieren.

Zusammenfassend lässt sich außerdem feststellen, dass die Echinokokkenvesikelflüssigkeit unter Zellkulturbedingungen auf die Chemokinexpression durch unreife Dendritische Zellen gesunder Probanden verschiedene modulierende Auswirkungen hat.

Eine zentrale Feststellung besteht darin, dass die Expression der Chemokine IL-12 und CXCL10 durch mit LPS stimulierte uDCs unter Anwesenheit von Echinokokkenvesikelflüssigkeit massiv (um jeweils ca. 80 bis 90%) gehemmt wird. Dem ist relativierend hinzuzufügen, dass das Gesamtniveau der Chemokinexpression in diesen beiden Fällen relativ niedrig gewesen war.

Desweiteren ist festzustellen, dass die Echinokokkenvesikelflüssigkeit untereinander vergleichbare Auswirkungen auf die Expression der Chemokine IL-1 und CXCL1 hat.

Zum Einen verstärkt sich die Expression dieser in erster Linie proinflammatorischen Chemokine unter Anwesenheit von LPS wie erwartet. Im Falle von CXCL1 besitzt die Vesikelflüssigkeit offenbar die Eigenschaft, die LPS-induzierte Chemokinproduktion sogar um ein Vielfaches weiter zu verstärken, was einen weiteren Hinweis auf den antigenen, immunstimulierenden Charakter der Bestandteile der Vesikelflüssigkeit gibt. Im Falle von IL-1 konnte diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden.

Zum Anderen scheint die Echinokokkenvesikelflüssigkeit auch ohne Verwendung von LPS ein – wenn auch schwächerer – Stimulus zur vermehrten Produktion von IL-1 und CXCL1 zu sein. Die Expression dieser Chemokine ist unter Anwesenheit von Vesikelflüssigkeit im Vergleich zur Produktion dieser Chemokine

unter reinen Mediumbedingungen zwei- bis dreimal höher. Dies kann einen weiteren Hinweis auf die Antigenität der Vesikelflüssigkeit geben und die Fähigkeit der uDcs, in vitro doch Reaktionen auf parasitäre Antigene zu zeigen. Selbstverständlich ist dem relativierend hinzuzufügen, dass die EVF eine Mischung aus verschiedenen Molekülen darstellt und damit möglicherweise einige Substanzen zusätzlich stimulierend (obwohl schwach) und einige auch stark hemmend auf die Produktion o. g. Chemokine wirken können.

4. DISKUSSION

Echinococcus multilocularis gehört nach wie vor zu den gefährlichsten Wurmparasiten überhaupt, die den Menschen befallen können. Dies ist vor allem auf seine Überlebensstrategie innerhalb des Wirtsorganismus zurückzuführen, die es ihm ermöglicht, einer effektiven Immunantwort zu entkommen und unbemerkt verheerende Organschäden anzurichten. Welche Mechanismen dieser Pathogenität, die hauptsächlich aus einer Modulation und Hemmung des Immunsystems besteht, zugrunde liegen, ist bis heute noch weitestgehend ungeklärt und seit vielen Jahren Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

Nicht nur *Echinococcus multilocularis*, sondern auch einige weitere Parasiten benutzen ihre Fähigkeit, bestimmte Komponenten des Immunsystems ihres Wirtsorganismus zugunsten ihres eigenen Überlebens zu modulieren. So zum Beispiel *Schistosoma mansoni*: Dieser Parasit vermag ein Chemokin-bindendes Protein zu sezernieren, um so eine gegen ihn gerichtete Entzündungsreaktion und Granulombildung zu dämpfen⁴⁸. Auch der obligat intrazellulär lebende Parasit *Leishmania chagasi* hat eine für ihn lebensverlängernde Strategie innerhalb des menschlichen Organismus entwickelt, indem er vermehrt das immunmodulierende TGF- β freisetzt^{49,2}.

Das Thema dieser Arbeit ist die Fähigkeit von *Echinococcus multilocularis*, einer effektiven Immunantwort zu entgehen und das Immunsystem für ihn günstig zu beeinflussen. Es wurde speziell die Funktion dendritischer Zellen als wichtige Komponente der angeborenen Immunität und der Freisetzung von Immunbotenstoffen der frühen Phase, also der akuten Entzündungsreaktion fokussiert. Diese spielen bei der Parasitenabwehr eine essenzielle Rolle und ihr Ausbleiben kann zu den bekannten gravierenden Krankheitsverläufen im Rahmen einer AE führen. Die im Ergebnisteil beschriebenen unterschiedlichen immunmodulatorischen Effekte der VF sollen nun diskutiert und in den Gesamtzusammenhang mit der derzeitigen Forschungssituation gebracht werden.

4.1 Auswirkungen von *Echinococcus multilocularis*-Antigenen auf die T-Zell-Proliferation

Die VF ist den Experimenten zufolge in der Lage, die OKT3-stimulierte T-Zell-Proliferation, die über membranständige Rezeptoren auf den T-Zellen gesteuert und reguliert wird, zu inhibieren. Dies stellt somit einen immunmodulatorischen Effekt der VF auf die T-Zell-Abwehr dar.

Es ist bekannt, dass die LPS- oder ConA-induzierte T-Zell-Proliferation bei BALB/c Mäusen in Gegenwart von *Echinococcus multilocularis*-Protoskizozysten gehemmt wird⁵⁰. Da sich diese Kopfanlagen in der menschlichen Leber jedoch nicht entwickeln, ist nicht sicher, ob diese bei Mäusen gemachte Beobachtung ohne Weiteres auf die vorliegenden Experimente übertragbar ist².

Dass *Echinococcus multilocularis* Auswirkungen auf die Lymphozytenproliferation *in vivo* hat, wurde schon früh nachgewiesen. So stellten Gottstein *et al.* in einer Arbeit von 1991 bei AE-Patienten aus Alaska, deren Läsionen überwiegend tote Parasiten enthielten, stark erhöhte Lymphozytenproliferationszahlen fest, während diese bei Patienten mit schwerer AE vermindert waren³¹.

Die durch *Echinococcus multilocularis*-Antigene verursachte Hemmung der T-Zell-Proliferation ist in einer Arbeit von Jenne *et al.* im Jahre 2001 näher analysiert worden. Dabei wurde *in vitro* versucht, uDCs nur durch Anwesenheit von Em-AG zur Reifung zu bringen, was nicht gelang. Es wurde vermutet, dass die Antigenaufnahme in die uDCs durch Komponenten der Em-AGs blockiert wird. Dies verhindert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch uDCs (s.u.) und somit auch die Stimulation auf die T-Lymphozyten, zu proliferieren. Auf diese Weise könnte sich der Bandwurm im menschlichen Körper weiter ungehindert ausbreiten⁵¹. Die Hemmung der T-Zell-Proliferation könnte also Konsequenz einer fehlenden Zytokinantwort durch nicht aktivierte uDCs sein.

Trotz der Hemmung der Lymphozytenproliferation bleibt höchstwahrscheinlich die Gesamtlymphozytenzahl *in vivo* weitestgehend unbeeinflusst. Bisher finden sich in der Literatur keine im Rahmen einer alveolären Echinokokkose reduzierten Lymphozytenzahlen – weder bei der Maus noch beim Menschen. Zwar ist bei

Patienten mit chronischer Echinokokkose die Zahl von CD4+ T-Gedächtnis-Zellen vermindert und eine generelle Hyporesponsivität der T-Zellen auf Echinokokkenantigene in vitro besteht ebenfalls ⁵², jedoch sind diese Ergebnisse nur schwer auf diese Experimente übertragbar. Denn in den Experimenten dieser Arbeit wurden PBMC verwendet. Diese stellen eine repräsentative T-Zell-Population dar, in der die Gedächtniszellen nur mit einem untergeordneten Anteil vertreten sind, so dass eine Verminderung dieser speziellen Population nicht ins Gewicht fallen würde. Außerdem soll ja dieses Experiment eine Frühphase der Infektion und einen Erstkontakt mit dem Antigen darstellen. Hierbei wurde vorausgesetzt, dass die Spender gesund und ohne bisherigen Kontakt zu Echinokokkenantigenen sind, was auf einen Großteil der Bevölkerung zutrifft, jedoch für meine Experimente nicht garantiert war. Abgesehen von diesen Einschränkungen ließ sich immer wieder eine reproduzierbare Hemmung der T-Zell-Proliferation nachweisen, was zu einer bereits bekannten gehemmten Immunreaktion in vivo im Bereich der Echinokokkenvesikel und einer damit verbundenen langen Latenzphase der alveolären Echinokokkose passt. Interessanterweise scheint die Vesikelflüssigkeit dabei ähnliche T-Zell-inhibitorische Fähigkeiten aufzuweisen wie die Laminarschicht der Vesikel bei Patienten mit alveolärer Echinokokkose. Wie genau in beiden Fällen diese Hemmung über den Oberflächenrezeptor vonstatten geht und welche Signalwege betroffen sind, bleibt Gegenstand der weiteren Forschung.

Eine weitere Interpretationsmöglichkeit ist hierbei zu beachten. Möglicherweise liegt in diesem Fall eine einfache kompetitive Hemmung des Oberflächenrezeptors auf den T-Zellen in Gegenwart der antigenen Proteine vor, so dass in Anwesenheit der Echinokokkenantigene vergleichsweise weniger stimulatorische Signale über den T-Zell-Rezeptor empfangen werden können. Es wäre interessant, diese Möglichkeit in weiterführenden mikrobiologischen oder auch pharmakologischen Testungen zu bestätigen, zu vertiefen oder auch auszuschließen.

4.2 Auswirkungen von *Echinococcus multilocularis*-Antigenen auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine

Echinococcus multilocularis hemmt die Freisetzung diverser proinflammatorischer Zytokine – dies ließ sich auch im Rahmen dieser Arbeit nachweisen. Nicht nur auf die LPS-induzierte IL-1-Produktion durch uDC *in vitro* hat die VF offenbar einen hemmenden Einfluss; vielmehr trat eine noch deutlichere Hemmung der IL-12-Freisetzung durch uDCs, die zuvor mit LPS stimuliert worden sind, ein. Das Zytokinprofil wurde um zwei proinflammatorische Chemokine erweitert, die bisher laut der aktuellen Literatur nicht oder nur selten auf ihre Reaktion auf Echinokokkenantigene getestet wurden: nämlich CXCL1 und CXCL10. Deren Freisetzung durch mit LPS stimulierte uDCs wird ebenfalls durch die Em-VF *in vitro* beeinflusst.

IL-1, hauptsächlich von Blut-Monozyten produziert, spielt eine zentrale Rolle in der Antwort des Organismus auf eine Reihe von Fremdeinflüssen. Insbesondere durch LPS lassen sich die betroffenen Zellen, hier uDCs, zu einer IL-1-Freisetzung anregen, was *in vivo* Fieber, Neutrophilie, Thrombozytose und einen Anstieg der Akut-Phase-Proteine und weiterer proinflammatorischer Zytokine bewirkt – allesamt Effekte, denen *Echinococcus multilocularis* im Wirtsorganismus zu entkommen anstrebt.

In dieser Arbeit wurde die LPS-induzierte IL-1-Produktion durch uDC *in vitro* durch die VF gehemmt. Auch Studien mit Immunzellen von AE-Patienten zeigten ähnliche Ergebnisse. Eger *et al.* stimulierten 2003 Patienten-PBMC mit Em-AG *in vitro* und stellten fest, dass die Freisetzung von IL-1 β und dem ebenfalls proinflammatorisch wirksamen IL-18 im Vergleich zu Gesunden gehemmt wurde⁵³.

Ein Verwandter des Fuchsbandwurms, nämlich *Echinococcus granulosus*, Erreger der zystischen Echinokokkose (CE), besitzt ebenfalls die Fähigkeit, die Immunantwort zu modulieren, indem er die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine hemmt. Torcal *et al.* fanden in den 90er-Jahren bei Patienten mit zystischer Echinokokkose im Vergleich zu Gesunden erniedrigte Serumkonzentrationen von IL-1 und TNF α ⁵⁴. Unterstrichen wird dies durch die

Befunde von Kanan und Chain zehn Jahre später. Sie isolierten uDCs aus dem Blut von CE-Patienten und stimulierten sie *in vitro* mit LPS und Hydatidenflüssigkeit von *Echinococcus granulosus*. Die Flüssigkeit hemmte dabei die Freisetzung der proinflammatorischen Botenstoffe IL-12, IL-6 und Prostaglandin E2⁵⁵.

IL-1 hat noch eine weitere wichtige Aufgabe: Es hemmt die Aktivität des Immunsystems, eine Th₂-Reaktion auszulösen. Bei der alveolären Echinokokkose liegt zumeist eine Mischreaktion aus Th₁ und Th₂, häufig auch eine Th₂-dominierte Immunantwort vor. Eine Th₁-Reaktion geht mit Entzündung, Granulombildung, Fibrose und massiver Schädigung des Wirtsgewebes einher, während eine Th₂-Immunantwort eher für Latenz, Chronizität und Erregerpersistenz steht⁵⁶. Somit könnte die Hemmung der IL-1-Freisetzung unter anderem zu den häufig chronischen Verläufen der AE beitragen.

Mehrere Studien, die in den letzten Jahren mit AE-Patienten durchgeführt worden sind, erhärten den Verdacht einer im Rahmen einer AE auftretenden Th₂-dominierten Immunantwort. Godot *et al.* stellten in den Jahren 1997 und 2000 bei AE-Patienten, deren PBMC mit Em-AG stimuliert wurden, hohe Basalproduktionen der Th₂-Zytokine IL-5 und IL-10 fest^{57, 58, 59}. Die durch Parasitenantigene stimulierte verstärkte IL-5-Freisetzung durch PBMC *in vitro* findet sich auch bei Patienten, die an einer zystischen Echinokokkose leiden⁶⁰.

Gleichzeitig werden jedoch auch Th₂-Zytokinprofile durch die parasitären Antigene beeinflusst. So fand zuletzt ein Mitglied der Arbeitsgruppe MacKenzie (Universität Düsseldorf) im Jahre 2008 heraus, dass die Freisetzung des antiinflammatorisch wirksamen Th₂-Zytokins IL-10 durch uDCs ebenfalls durch die VF gehemmt wird². Die immunmodulatorischen Effekte von *Echinococcus multilocularis* sind folglich nicht durch simple „Verschiebungen“ der T-Zell-Antwort zu erklären, sondern unterliegen sicherlich komplexeren Mechanismen, die noch tiefgründiger erforscht werden müssen.

Unstimulierte uDCs können hier nachweislich durch die VF zu einer schwachen IL-1 Produktion angeregt werden. Somit scheint eine, wenn auch schwache, Antwort auf Antigene des Parasiten zu existieren. Dies könnte im Widerspruch zur Arbeit

von Jenne et al. stehen, wobei in dieser Arbeit ja beschrieben wurde, dass uDCs ausschließlich durch Stimulation mit dem Echinokokkenantigen nicht zur Reifung gebracht werden können, vielmehr hierfür proinflammatorische Kostimulanzen erforderlich waren, welche spontan offenbar durch die uDCs nicht produziert worden sind.

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes proinflammatorisches Zytokin ist das IL-12. Dessen Freisetzung durch uDCs wurde meinen Ergebnissen zufolge ebenfalls durch die VF gehemmt. Somit scheinen die VF oder bestimmte Bestandteile dieser eine entzündliche Antwort, wie sie hier beispielhaft dargestellt wird, zumindest teilweise durch eine IL-12-Hemmung unterbinden zu können.

IL-12 besitzt, ähnlich wie IL-1, eine zentrale Funktion in der Stimulation und Fortdauer einer Th₁-Antwort, besonders durch die Induktion des wichtigen proinflammatorischen Zytokins Interferon- γ (IFN- γ)⁶¹ und hat Einfluss auf den Verlauf von intrazellulären Infektionen. Es wird von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten und auch von B-Lymphozyten produziert. Starke Reize zu seiner Produktion sind Bakterien oder deren Produkte, aber auch Parasiten. Die Wichtigkeit dieser Reize schlägt sich auch auf die Versuche der vorliegenden Arbeit nieder. In den vorliegenden Experimenten ließen sich die uDCs unter Anwesenheit von VF zu keiner messbaren IL-12-Produktion anregen. Auch PMA zeigte keinen verstärkenden Effekt. Erst durch LPS waren hohe Zytokinkonzentrationen messbar, deren Freisetzung durch die VF gehemmt wurde.

Eine weitere wichtige Aufgabe von IL-12 ist die Regulation der IgE-Synthese durch B-Lymphozyten. Dabei wird in vivo die IgE-Synthese bei hohen IL-12-Spiegeln gehemmt, während niedrige IL-12-Spiegel die IgE-Synthese induzieren⁶². Das parasitenwirksame IgE ist erfahrungsgemäß bei einer Infektion mit *Echinococcus multilocularis* eher selten erhöht, vermutlich aufgrund einer weiteren Form der Immunmodulation durch den Parasiten. Dies ist für eine Helmintheninfektion ungewöhnlich.

IL-12 scheint aber speziell bei der AE eine weitere, wichtige Rolle zu spielen. Im Mausexperiment ist IL-12, das in rekombinanter Form an AE erkrankten Mäusen

verabreicht worden ist, in der Lage, eine hepatische alveoläre Echinokokkose in Bezug auf Parasitenlast, Larvenwachstum, Organzerstörung und Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen⁶³.

Hierin könnte einer der immunologischen Escape-Mechanismen der Echinokokken liegen, da durch die IL-12-Hemmung erneut der Frühphase der inflammatorischen, antiparasitären Th₁-Reaktion entgegengewirkt wird. Eine effektivere Immunantwort unter IL-12-Substitution, wie im Mausexperiment beschrieben, passt somit gut in diesen Zusammenhang.

In den vergangenen Jahren wurden auch beim Menschen die Profile dieses Zytokins analysiert. Im Jahre 1999 stellten Wellinghausen *et al.* fest, dass die IL-12 Serumkonzentrationen bei AE-Patienten ähnlich hoch waren wie bei Gesunden, Hübner *et al.* stellten 2006 eher verminderte IL-12-Serumkonzentrationen bei dieser Patientengruppe fest. Beide Ergebnisse betonten erneut die hohe Wahrscheinlichkeit einer eher Th₂-dominierten Immunantwort bei AE-Patienten^{64, 56}. In einigen *in vitro*-Experimenten wurde festgestellt, dass die IL-12-Konzentrationen, die von peripheren Blutzellen von AE-Patienten in Ko-Kultur mit Echinokokkenvesikeln freigesetzt werden, mit dem jeweiligen Grad der Erkrankung des Patienten korrelieren⁶⁵. Somit wäre es auch im Rahmen dieser Arbeit interessant gewesen, die Experimente zum Vergleich zusätzlich mit Patientenblut durchzuführen, um herauszufinden, wie sich dies in den IL-12-Messungen niedergeschlagen kann.

Eine Arbeit aus dem Jahre 2006 beschäftigt sich mit dieser Problematik. PBMC von AE-Patienten wurden *in vitro* mit Em-Kulturüberstand bzw. Em-Vesikeln stimuliert. Im Vergleich zu Gesunden ergab sich eine reduzierte IL-12-Expression durch die PBMC. Unter Zusatz von LPS hemmten die Echinokokkenantigene die IL-12- und auch die TNF α -Freisetzung. Weitere interessante Erkenntnisse zeigen sich, wenn man den Versuch zusätzlich durch das Immunzellstimulans PHA bzw. dessen Verwandten PMA ergänzt. Im Gegensatz zu LPS wirkt PMA membranrezeptorunabhängig und aktiviert die intrazellulär gelegene Proteinkinase C⁶⁶. So kann man herausfinden, an welcher Stelle des Signalweges die parasitären Antigene angreifen und diesen blockieren². Die Differenz in der Zytokinproduktion zwischen Patienten und Gesunden lag in oben genannter Arbeit unter Stimulation der Zellen mit PHA nicht mehr vor⁵⁶. In einer weiteren, aktuellen

Arbeit wurden uDCs mit LPS bzw. PMA inkubiert, jeweils auch mit und ohne Em-VF. Die Bestimmung der TNF α - und IL-10-Freisetzung wurde mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich (neben der oben schon erwähnten Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung der Zytokine), dass die VF keinen Einfluss auf die PMA-induzierte Zytokinproduktion zu haben schien. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass durch die VF eher die transmembranösen, also die auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptorabschnitte angegriffen und gehemmt werden². Dazu passen auch die oben erwähnten Ergebnisse der Interaktion der Echinokokken-VF mit Oberflächenrezeptoren von T-Zellen, hier im Sinne einer Hemmung der OKT3-induzierten T-Zell-Proliferation, die über das Oberflächenmolekül CD3 reguliert wird.

Um diese Erkenntnisse auf die hier vorliegenden uDCs anzuwenden, erfolgte während der Versuche parallel auch stets eine Stimulation der Zellen mit PMA. Leider lieferten diese Experimente keinerlei signifikante Ergebnisse.

Die Fachliteratur liefert hinsichtlich der IL-12-Profile Informationen über Parallelen zu weiteren Parasiten. So wird zum Beispiel die IL-12-Expression durch LPS-stimulierte uDCs ebenfalls durch Antigene des Parasiten *Schistosoma mansoni* gehemmt⁶⁷.

Insofern passt die Hemmung der Freisetzung dieses proinflammatorischen Zytokins gut in das Gesamtbild der Immunpathogenität von *Echinococcus multilocularis*. In dieser Arbeit galt es auch herauszufinden, inwieweit die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine durch Antigene des Parasiten beeinflusst wird.

Die Messungen der Freisetzung des proinflammatorischen Chemokins CXCL10 wiesen deutliche Parallelen zu den Ergebnissen der IL-12-Messungen auf. CXCL10 wirkt chemotaktisch auf Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, NK-Zellen und dendritische Zellen, spielt eine zentrale Rolle bei der T-Zell-Adhäsion am Endothel und an der gesamten Th₁-Reaktion.

Auch in diesem Fall stellt die VF allein (und auch PMA) keinen Stimulus einer vermehrten CXCL10-Sekretion für die uDCs dar. Bei Stimulierung mit LPS wird CXCL10 freigesetzt. Diese Freisetzung wird wiederum durch die VF gehemmt.

Die Rolle von CXCL10 bei der alveolären Echinokokkose ist noch ungeklärt. Bekannt ist aber, dass diesem Chemokin wichtige Bedeutungen in anderen Parasitosen zukommen, zum Beispiel bei einer Infektion mit *Leishmania amazonensis*. Eine lokale Behandlung parasitärer Läsionen, die infizierten Mäusen zugeführt worden sind, mit CXCL10 aktiviert die Makrophagenzytotoxizität und verzögert so die Entwicklung der Läsionen, vorwiegend über eine Induktion von IFN- γ und IL-12. In weiterführenden Versuchen wurden auch dendritische Zellen dieser Mäuse untersucht. Während uninfizierte DCs unter CXCL10-Behandlung vermehrt IL-12 und weniger IL-10 exprimieren, ist bei infizierten DCs das Gegenteil der Fall. Wird in diesem Falle das freigesetzte IL-10 eliminiert, kommt es erneut zu einer verstärkten IL-12-Freisetzung, einer damit verbundenen erhöhten T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Freisetzung durch T-Zellen. Werden diese wiederum mit CXCL10 behandelt, resultiert daraus eine erhöhte IL-12-Empfindlichkeit und erneut eine gesteigerte Freisetzung von IFN- γ . CXCL10 scheint also für eine effektive Th1-Immunantwort im Rahmen dieser Parasitenerkrankung essenziell zu sein ⁶⁸.

Ähnliches ist der Fall bei einer Infektion mit dem Verwandten *Leishmania brasiliensis*. PBMC gesunder Probanden setzen bei einer Infektion mit dem Erreger vermehrt CXCL10 und IL-10 frei. Serumwerte von CXCL10 sind bei Patienten mit Amerikanischer Hautleishmaniasis vermehrt messbar. Erfahrungsgemäß führen dieses und noch weitere proinflammatorische Chemokine zu einem schwererem Krankheitsverlauf ⁶⁹.

Ein weiteres eindrucksvolles Beispiel für einen parasitären Einfluss auf die Chemokinfreisetzung findet sich bei der afrikanischen Trypanosomiasis, einer Infektion durch den Parasiten *Trypanosoma brucei*. In einer Studie wurden im Gehirn infizierter Mäuse Chemokine gemessen. Dabei stiegen die Konzentrationen von CXCL10 und CCL28 im Gehirn signifikant an. Interessanterweise produzierten infizierte, IFN- γ -defiziente Mäuse weniger CXCL10. Bei infizierten, CXCL10- oder CXCR3-defizienten Mäusen stieg die

Parasitenlast an und die T-Zell-Akkumulation nahm ab ⁷⁰. Dies zeigt, welche wichtige Rolle CXCL10 – in dem Fall zur T-Zell-Rekrutierung ins Gehirn – bei Parasitosen einnehmen kann. Diese Erkenntnis und auch die vorliegenden Ergebnissen der Experimente sollten dazu animieren, die Rolle dieses Chemokins und auch noch weiterer Chemokine im Rahmen einer AE weiterführend zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde noch die Rolle eines weiteren Chemokins in Gegenwart der parasitären Antigene untersucht. CXCL1, in natura freigesetzt von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen, spielt eine zentrale Rolle bei der Neutrophilenchemotaxis, besonders der Rekrutierung von Leukozyten in inflammatorisches Gewebe. In den Experimenten reagierten die uDCs, sowohl mit als auch ohne Zusatz von LPS, auf die VF mit einer verstärkten CXCL1-Freisetzung. Im Vergleich dazu führt die Stimulierung durch PMA zu keiner nennenswerten CXCL1-Expression; sie bleibt wiederum unerwartet unter den Basiswerten. Wenn man dieses mutmaßliche Materialproblem der Experimentierreihe und das zugegebenermaßen relativ niedrige Gesamtniveau der Werte außer Acht lässt, bietet sich noch etwas Raum für weiterführende Reflexionen.

Man kann spekulieren, dass die VF hier eine generell potenzierende Rolle spielt, so dass dadurch die Expression unter allen verschiedenen Versuchsanordnungen ähnlich gesteigert wird. Echinokokkenantigene können folglich bei Gesunden auch ihren antigenen Charakter erkennen lassen, was der Natur schließlich entspricht.

Misst man die Chemokinfreisetzung bei AE-Patienten, deren periphere Blutzellen mit Echinokokkenantigenen *in vitro* stimuliert worden sind, so finden sich in diesem Falle ebenfalls erhöhte Werte von CXCL1 im Vergleich zu Gesunden, ebenso wie erhöhte Werte von CCL3, 4 und 5, die hauptsächlich chemotaktisch auf NK-Zellen und Neutrophile wirken. Demgegenüber reagierten die PBC der Patienten auf Echinokokkenvesikel mit einer verminderten Freisetzung von CXCL1, während CCL3, 4 und 5 erhöht blieben ⁷¹.

Der Helminth scheint also auch auf komplexe Weise Chemokinprofile zu modulieren. Die Ausweitung der Erforschung dieser Profile stellt eine

Herausforderung, aber auch die Chance für die Zukunft dar, die Immunpathomechanismen während einer AE ergründen zu können.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen von Untersuchungen an Immunzellen erkrankter Patienten und infizierter Mäuse und an immunkompetenten Zellen gesunder Probanden, die in Kontakt mit Echinokokkenantigenen bzw. Vesikelflüssigkeit gebracht wurden, gelangte man immer wieder zu folgendem Ergebnis: der Humanparasit *Echinococcus multilocularis* übt einen Einfluss auf die menschliche Immunantwort aus, moduliert sie und vermag sie in manchen Teilen sogar auszuschalten. Welche zum Teil erheblichen Auswirkungen der Helminth auf die Zytokin- und Chemokinproduktion diverser Zellen des Immunsystems zugunsten seines eigenen Überlebens hat, thematisieren zahlreiche Forschungsarbeiten der letzten Jahre.

Diese Arbeit beschäftigte sich in erster Linie mit dem hemmenden Einfluss der Echinokokken-Vesikelflüssigkeit auf die OKT3-induzierte T-Zell-Proliferation und auf die Modulation der Freisetzung der Zyto- und Chemokine IL-1, IL-12, CXCL1 und CXCL10. Dabei stellte sich heraus, dass die IL-1-, IL-12- und CXCL10-Expression LPS-stimulierter dendritischer Zellen durch die Vesikelflüssigkeit gehemmt und die CXCL1-Expression dieser Zellen gesteigert werden. Ebenso führt die Vesikelflüssigkeit zu einer leichten Steigerung der Spontanfreisetzung von IL-1 und CXCL1 durch unreife dendritische Zellen.

Diese Erkenntnis bestätigt einen Teil der bisher vorliegenden Studien, widerspricht manchen aber auch. Vor Allem aber soll diese Arbeit den bisherigen Kenntnisstand über die Auswirkungen und Fähigkeiten des Erregers um die Erkenntnis ergänzen, dass in vitro stimulierte unreife dendritische Zellen ebenfalls den immunmodulatorischen Effekten von *Echinococcus multilocularis* unterliegen, genau wie sämtliche andere bisher untersuchte Zellen des Organ- oder Immunsystems auch. Außerdem konnten weiterführende Ergebnisse in der noch relativ jungen Chemokinforschung erzielt werden. So werden vielleicht in Kürze

neben den Zytokinprofilen auch die relevanten Chemokinprofile komplettiert, was dann in der Echinokokkenforschung weitere Erkenntnisse möglich machen könnte.

Trotz aller derzeit noch existierenden Unklarheiten bezüglich der Pathomechanismen von *Echinococcus multilocularis* gibt es auch neue Ansätze in der Parasitenforschung. So hat eine Forschergruppe vor kurzem einen möglicherweise wichtigen Pathogenitätsfaktor des Parasiten entdeckt. In vitro generierte Vesikelflüssigkeit bzw. Echinokokkenantigene besitzen eine Cysteinprotease, die in der Lage ist, das CC-Chemokin Eotaxin abzubauen und dadurch bei intraperitonealer Infektion von Mäusen für das Ausbleiben einer ausreichenden Eosinophilenantwort im Peritoneum verantwortlich ist ⁷². Zwar bleibt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine hepatische AE beim Menschen noch fraglich, jedoch könnte diese Entdeckung einige Erklärungen bezüglich der veränderten Chemokinprofile *in vitro* und *in vivo* liefern. Eine weiterführende Untersuchung, insbesondere ob es noch weitere Proteasen gibt, die andere Zyto- und Chemokine metabolisieren können oder ob die gefundene Protease sogar unspezifisch auf diverse Botenstoffe reagiert, stellt eine hoffnungsvolle Perspektive in der gesamten immunparasitologischen Forschung dar.

Weiterer Forschung bedarf es auch hinsichtlich einer genaueren Aufschlüsselung der Struktur, Zusammensetzung und Funktion der Metazestoden. So könnten bisher noch unerkannte parasitäre Antigene nähere Erkenntnisse bezüglich der Wirkungsweise des Erregers liefern. Auch weitergehende Analysen der Interaktion von *Echinococcus multilocularis* mit Komponenten des angeborenen und erworbenen Immunsystems sollen zum Ziel gesetzt werden.

Literatur

1. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392 (6673) :245-252.
2. Voigt N. Immunregulation des Humanparasiten *Echinococcus multilocularis*. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Dissertation, 2008.
3. Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002;82 (1) :97-130.
4. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S et al. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol* 2002;119 (5) :1096-1102.
5. Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Slomchik. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
6. Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160 (9) :4587-4595.
7. Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R et al. Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity* 1997;7 (4) :549-557.
8. Jacobi A, Manger B, Schuler G, Hertl M. [Therapeutic application of TNF-alpha inhibitors infliximab and etanercept in inflammatory skin disorders]. *J Dtsch Dermatol Ges* 2003;1 (4) :259-272.
9. Matsumoto J, Muller N, Hemphill A, Oku Y, Kamiya M, Gottstein B. 14-3-3- and II/3-10-gene expression as molecular markers to address viability and growth activity of *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* 2006;132 (Pt 1) :83-94.
10. Robert Keller. *Immunologie und Immunpathologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart; 1994.
11. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005;201 (9) :1355-1359.

12. Segal BM, Klinman DM, Shevach EM. Microbial products induce autoimmune disease by an IL-12-dependent pathway. *J Immunol* 1997;158 (11) :5087-5090.
13. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12 (2) :121-127.
14. Muller A, Homey B, Soto H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410 (6824) :50-56.
15. Bradley LM, Asensio VC, Schioetz LK et al. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 1999;162 (5) :2511-2520.
16. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol* 2006;7 (12) :243.
17. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270 (45) :27348-27357.
18. Arenberg DA, Polverini PJ, Kunkel SL et al. The role of CXC chemokines in the regulation of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Leukoc Biol* 1997;62 (5) :554-562.
19. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382 (6592) :635-638.
20. Cao X, Zhang W, He L et al. Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. *J Immunol* 1998;161 (11) :6238-6244.
21. Imai T, Yoshida T, Baba M, Nishimura M, Kakizaki M, Yoshie O. Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence trap using Epstein-Barr virus vector. *J Biol Chem* 1996;271 (35) :21514-21521.
22. Vicari AP, Figueroa DJ, Hedrick JA et al. TECK: a novel CC chemokine specifically expressed by thymic dendritic cells and potentially involved in T cell development. *Immunity* 1997;7 (2) :291-301.

23. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188 (2) :373-386.
24. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277 (5334) :2005-2007.
25. Kellermann SA, Hudak S, Oldham ER, Liu YJ, McEvoy LM. The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol* 1999;162 (7) :3859-3864.
26. Gottstein B. [Epidemiology and systematics of cystic and alveolar hydatid disease]. *Chirurg* 2000;71 (1) :1-8.
27. Eckert J, Muller B, Partridge AJ. The domestic cat and dog as natural definitive hosts of *Echinococcus (alveococcus) multilocularis* in southern federal republic of Germany. *Tropenmed Parasitol* 1974;25 (3) :334-337.
28. Universität Ulm. <http://www.uni-ulm.de/echinokokkose/html/fallzahlen.html>. Koordinator: Prof.Dr.Peter Kern, editor. 2011. Online Source. Letztes Zugriffsdatum: 08.08.2013
29. Berufsverband deutscher Internisten. http://www.internisten-im-netz.de/de_news_6_0_405_mehr-fuchsbandwurm-infektionen-in-deutschland.html. 2011. Online Source. Letztes Zugriffsdatum: 08.08.2013
30. Ingold K, Gottstein B, Hemphill A. Identification of a laminated layer-associated protein in *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Parasitology* 1998;116 (Pt 4) :363-372.
31. Gottstein B, Mesarina B, Tanner I et al. Specific cellular and humoral immune responses in patients with different long-term courses of alveolar echinococcosis (infection with *Echinococcus multilocularis*) . *Am J Trop Med Hyg* 1991;45 (6) :734-742.
32. Wilson JF, Rausch RL, McMahon BJ, Schantz PM. Parasitocidal effect of chemotherapy in alveolar hydatid disease: review of experience with mebendazole and albendazole in Alaskan Eskimos. *Clin Infect Dis* 1992;15 (2) :234-249.

33. Gottstein B. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Microbiol Rev* 1992;5 (3) :248-261.
34. Eckert J, Deplazes P. Alveolar echinococcosis in humans: the current situation in Central Europe and the need for countermeasures. *Parasitol Today* 1999;15 (8) :315-319.
35. Eckert J, Ammann R. [The so-called "fox tapeworm"]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1990;132 (2) :92-98.
36. Godot V, Harraga S, Beurton I et al. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. I. Comparison of patients with progressive and abortive lesions. *Clin Exp Immunol* 2000;121 (3) :484-490.
37. Dai WJ, Hemphill A, Waldvogel A et al. Major carbohydrate antigen of *Echinococcus multilocularis* induces an immunoglobulin G response independent of alpha β ⁺ CD4⁺ T cells. *Infect Immun* 2001;69 (10) :6074-6083.
38. Jenkins P, Dixon JB, Rakha NK, Carter SD. Regulation of macrophage-mediated larvicidal activity in *Echinococcus granulosus* and *Mesocestoides corti* (Cestoda) infection in mice. *Parasitology* 1990;100 Pt 2:309-315.
39. Wen H, Craig PS. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51 (6) :741-748.
40. Dreweck CM, Luder CG, Soboslay PT, Kern P. Subclass-specific serological reactivity and IgG4-specific antigen recognition in human echinococcosis. *Trop Med Int Health* 1997;2 (8) :779-787.
41. Gottstein B, Eckert J, Woodtli W. Determination of parasite-specific immunoglobulins using the ELISA in patients with echinococcosis treated with mebendazole. *Z Parasitenkd* 1984;70 (3) :385-389.
42. Vuitton DA, Bresson-Hadni S, Lenys D et al. IgE-dependent humoral immune response in *Echinococcus multilocularis* infection: circulating and basophil-bound specific IgE against *Echinococcus* antigens in patients with alveolar echinococcosis. *Clin Exp Immunol* 1988;71 (2) :247-252.
43. Eckert J, Thompson RC, Mehlhorn H. Proliferation and metastases formation of larval *Echinococcus multilocularis*. I. Animal model, macroscopical and histological findings. *Z Parasitenkd* 1983;69 (6) :737-748.

44. Urban JF, Jr., Madden KB, Svetic A et al. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol Rev* 1992;127:205-220.
45. Liance M, Vuitton DA, Guerret-Stocker S, Carbillet JP, Grimaud JA, Houin R. Experimental alveolar echinococcosis. Suitability of a murine model of intrahepatic infection by *Echinococcus multilocularis* for immunological studies. *Experientia* 1984;40 (12) :1436-1439.
46. Liance M, Bresson-Hadni S, Vuitton D, Bretagne S, Houin R. Comparison of the viability and developmental characteristics of *Echinococcus multilocularis* isolates from human patients in France. *Int J Parasitol* 1990;20 (1) :83-86.
47. Williamson E, Bilsborough JM, Viney JL. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF-kappa B (RANK) /RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol* 2002;169 (7) :3606-3612.
48. Smith P, Fallon RE, Mangan NE et al. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 2005;202 (10) :1319-1325.
49. Gantt KR, Schultz-Cherry S, Rodriguez N et al. Activation of TGF-beta by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. *J Immunol* 2003;170 (5) :2613-2620.
50. Kizaki T, Ishige M, Kobayashi S et al. Suppression of T-cell proliferation by CD8+ T cells induced in the presence of protoscolices of *Echinococcus multilocularis* in vitro. *Infect Immun* 1993;61 (2) :525-533.
51. Jenne L, Arrighi JF, Sauter B, Kern P. Dendritic cells pulsed with unfractionated helminthic proteins to generate antiparasitic cytotoxic T lymphocyte. *Parasite Immunol* 2001;23 (4) :195-201.
52. Manfras BJ, Reuter S, Wendland T, Boehm BO, Kern P. Impeded Th1 CD4 memory T cell generation in chronic-persisting liver infection with *Echinococcus multilocularis*. *Int Immunol* 2004;16 (1) :43-50.
53. Eger A, Kirch A, Manfras B, Kern P, Schulz-Key H, Soboslay PT. Pro-inflammatory (IL-1beta, IL-18) cytokines and IL-8 chemokine release by PBMC in response to *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. *Parasite Immunol* 2003;25 (2) :103-105.

54. Torcal J, Navarro-Zorraquino M, Lozano R et al. Immune response and in vivo production of cytokines in patients with liver hydatidosis. *Clin Exp Immunol* 1996;106 (2) :317-322.
55. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology* 2006;118 (2) :271-278.
56. Hubner MP, Manfras BJ, Margos MC et al. *Echinococcus multilocularis* metacestodes modulate cellular cytokine and chemokine release by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis patients. *Clin Exp Immunol* 2006;145 (2) :243-251.
57. Godot V, Harraga S, Deschaseaux M et al. Increased basal production of interleukin-10 by peripheral blood mononuclear cells in human alveolar echinococcosis. *Eur Cytokine Netw* 1997;8 (4) :401-408.
58. Godot V, Harraga S, Beurton I et al. Resistance/susceptibility to *Echinococcus multilocularis* infection and cytokine profile in humans. II. Influence of the HLA B8, DR3, DQ2 haplotype. *Clin Exp Immunol* 2000;121 (3) :491-498.
59. Sturm D, Menzel J, Gottstein B, Kern P. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. *Infect Immun* 1995;63 (5) :1688-1697.
60. Rigano R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin Exp Immunol* 1996;105 (3) :456-459.
61. Brunda MJ, Rosenbaum D. Modulation of murine natural killer cell activity in vitro and in vivo by recombinant human interferons. *Cancer Res* 1984;44 (2) :597-601.
62. Germann T, Guckes S, Bongartz M et al. Administration of IL-12 during ongoing immune responses fails to permanently suppress and can even enhance the synthesis of antigen-specific IgE. *Int Immunol* 1995;7 (10) :1649-1657.
63. Emery I, Leclerc C, Sengphommachanh K, Vuitton DA, Liance M. In vivo treatment with recombinant IL-12 protects C57BL/6J mice against secondary alveolar echinococcosis. *Parasite Immunol* 1998;20 (2) :81-91.

64. Wellinghausen N, Gebert P, Kern P. Interleukin (IL) -4, IL-10 and IL-12 profile in serum of patients with alveolar echinococcosis. *Acta Trop* 1999;73 (2) :165-174.
65. Dreweck CM, Soboslay PT, Schulz-Key H, Gottstein B, Kern P. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles. *Parasite Immunol* 1999;21 (8) :433-438.
66. Kharfan-Dabaja M, Ayala E, Lindner I et al. Differentiation of acute and chronic myeloid leukemic blasts into the dendritic cell lineage: analysis of various differentiation-inducing signals. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54 (1) :25-36.
67. Kane CM, Cervi L, Sun J et al. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 2004;173 (12) :7454-7461.
68. Vasquez RE, Xin L, Soong L. Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun* 2008;76 (1) :161-169.
69. Vargas-Inc, Hogg AE, Tulliano G et al. CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun* 2010;78 (1) :301-308.
70. Amin D. RM. CXCL10 and CXCR3 modulate morbidity and brain invasion by parasites and T-cells in an African Trypanosomiasis mouse model. *BMC Proceedings* 2: 1 . 2008. Poster Presentation.
71. Kocherscheidt L, Flakowski AK, Gruner B et al. *Echinococcus multilocularis*: inflammatory and regulatory chemokine responses in patients with progressive, stable and cured alveolar echinococcosis. *Exp Parasitol* 2008;119 (4) :467-474.
72. Mejri N, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* metacestode metabolites contain a cysteine protease that digests eotaxin, a CC pro-inflammatory chemokine. *Parasitol Res* 2009;105 (5) :1253-1260.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne eine Vielzahl an Beteiligten nicht möglich gewesen.

Allen voran danke ich dem Institut für medizinische Mikrobiologie, insbesondere Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung materieller und finanzieller Mittel zur Ausübung meiner Experimente und den Arbeitsgruppenleitern Herrn Prof. Dr. Colin MacKenzie, der mir immer mit Rat und Tat unterstützend zur Seite stand, Herrn Prof. Dr. Walter Däubener, der mein Interesse an dem Institut geweckt hat und Prof. Dr. Birgit Henrich, Dr. Stefanie Scheu und Dr. Sandra Beer, die mich speziell in meiner molekularbiologischen Arbeit unterstützt haben.

Auch möchte ich den zahlreichen Mitgliedern der Arbeitsgruppen danken, mit deren Hilfe, Anleitungen und Vorschlägen zur Problemlösung ich meine Experimente planen und durchführen konnte.

Besonderer Dank geht dabei an Raquel Guandarrama-Gonzalez, Silke Stuhlsatz, Dr. Nina Voigt und Dr. Cornelia Beuter-Gunia.

Ebenfalls danken für ihre Hilfe und für viele nette Gespräche möchte ich (in alphabetischer Reihenfolge) Dana Belick, Karin Buchholz, Daniel Degrandi, Philip Dresing, Kathrin Heseler, Magdalena Kocur, Sonja Kropp, Felix Lubitz, Anne Mausberg, Anika Müller, Silvia Schmidt, Wilfried Schwippert und Kathrin Spekter.

Für ihre Mitarbeit an meinen Experimenten möchte ich auch der Arbeitsgruppe der Universitäts-Hautklinik danken, besonders dessen Leiter Prof. Dr. Homey und den Mitarbeitern Erich Bünemann und Sabine Kellermann.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern Rainer und Gisela und meiner Frau Karina, die mir Kraft, Mut und Beistand während der Studienzeit und auch in allen anderen Lebensphasen gegeben haben und denen ich diese Arbeit widme.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Velbert, den 26.08.2013

Alexander Papenheim