

Diplomarbeit

Die Symbiose zwischen Wolbachia und Filarioidea

Medizinische Bedeutung und molekularbiologischer Hintergrund

eingereicht von

Katharina Haring

Mat.Nr.: 0433017

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

Ao.Univ.-Prof. Dr. Franz F. Reinthaler

und

Dr. Doris Haas

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 23.2.2010

Katharina Haring

Vorwort

Ich danke Frau Dr. Doris Haas und Herrn Prof. Franz F. Reinthaler, Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin für die Betreuung der Diplomarbeit und ihre Unterstützung.

Zusammenfassung

Die Diplomarbeit soll einen Überblick über das Verhältnis zwischen Filarie (dt. Fadenwurm) und ihrem intrazellulär lebenden Bakterium Wolbachia geben.

Millionen von Menschen sind durch Filariose und den damit verbundenen Auswirkungen wie Lymphangitis, Elephantiasis oder Erblindung betroffen. Vor allem die Erreger *Onchocercus volvulus*, *Wuchereria bancrofti* und *Brugia malayi* sind die am weitverbreitetsten Erreger. Diese Filarienarten wurden vor allem in den 1990er Jahren durch die Weiterentwicklung molekularbiologischer Untersuchungsmethoden auf das Vorkommen von Wolbachia getestet. Es wurden diverse Stoffwechsel- und Austauschwege zwischen Wurm und Bakterie exploriert. Diese Wege werden in dieser Arbeit beschrieben und eine mögliche Therapie erörtert. Des Weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit der Beeinflussung der Filarienfortpflanzung durch Wolbachia. Durch die Intervention bei der Fortpflanzung stellt Wolbachia das eigene Überleben über Generationen sicher.

Durch die Entdeckung eines symbiontisch lebenden Bakteriums im Wurm konnten neue Therapieschemata mittels Antibiotika und antibakterielle Therapien erforscht werden. Neue Therapieansätze, beispielsweise eine Impfung oder eine Strahlentherapie, werden in dieser Arbeit erläutert.

Abstract

This diploma thesis gives an overview of the relation between filarial nematode worms and its intracellular living bacteria Wolbachia.

Millions of people over the world are threatened by filariasis and its symptoms like Lymphangitis, Elephantiasis or Blindness. Above all, the worms *Onchocercus volvulus*, *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi* are the most common worms. Due to the fast development of molecular biological methods in the 1990s, these worms were foremost tested on the appearance of Wolbachia. Several ways of metabolism and exchange between worm and bacteria were explored and these ways could be used as targets for new treatment against filariasis. Moreover the bacteria have a peculiar way to influence the reproduction of its host. Because of this Wolbachia ensures its survival over several host-generations.

Based on the exploration of this symbiotic bacterium, new procedures using antibiotics and other antibacterial medications could be developed. Other methods, such as a vaccine against filariasis or radiotherapy are illustrated in this report.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ÜBERBLICK ÜBER DIE VERSCHIEDENEN KRANKHEITSBILDER VERURSACHT DURCH FILARIOIDEA	1
1.1 ALLGEMEINES	1
1.2 ENTWICKLUNGSZYKLUS	3
1.3 ÜBERBLICK DER ERREGER	4
1.4 <i>WUCHERERIA BANCROFTI</i> UND <i>BRUGIA MALAYI</i>	5
1.4.1 <i>Wuchereria bancrofti</i>	5
1.4.2 <i>Brugia malayi</i>	6
1.5 <i>ONCHOCERCUS VOLVULUS</i>	6
2. DAS BAKTERIUM WOLBACHIA	8
2.1 GESCHICHTE DER ENTDECKUNG VON WOLBACHIA	8
2.2 EINTEILUNG UND AUFBAU DER BAKTERIE	9
2.3 EVOLUTION/PHYLOGENIE	11
2.4 GENOM, BIOCHEMIE	15
3. DIE SYMBIOSE ZWISCHEN WOLBACHIA UND FILARIEN.....	17
3.1 STOFFAUSTAUSCH.....	17
3.2 WOLBACHIA BEEINFLUSST DIE FORTPFLANZUNG.....	18
3.3 INTERAKTION VON WOLBACHIA MIT IMMUNSYSTEM	20
3.4 AUSWIRKUNG VON WOLBACHIA AUF DIE FORTPFLANZUNG BEI INSEKTEN	31
4. THERAPIE	33
4.1 THERAPIE MIT ANTHELMINTIKA	33
4.2 THERAPIE MIT ANTIBIOTIKA	34
4.3 NACHTEILE UND VORTEILE EINER ANTIBIOTIKA THERAPIE	39
4.4 MODERNE THERAPIEANSÄTZE	39
5. DISKUSSION	41
6. LITERATURVERZEICHNIS	44
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	50
8. TABELLENVERZEICHNIS	51

1. ÜBERBLICK ÜBER DIE VERSCHIEDENEN KRANKHEITSBILDER VERURSACHT DURCH FILARIOIDEA

Die zur Überfamilie der Filarioidea (dt. Begriff Fadenwürmer) gehörenden Nematoden Gattungen sind vielleicht besser bekannt unter dem Sammelbegriff Filarien. Filarioidea gehören in die Ordnung Spirurida und Phylum Nematoda (siehe Abb. 1). Filarien sind unsegmentierte, einige Millimeter bis 1m lange Würmer.

Filarien verursachen verschiedene Arten von Krankheitsbildern, dennoch benötigen alle Arthropoden (Insekten) als Zwischenwirte und Überträger. Der Erreger *Wuchereria bancrofti* löst beispielsweise beim Menschen die sogenannte lymphatische Filariose aus.

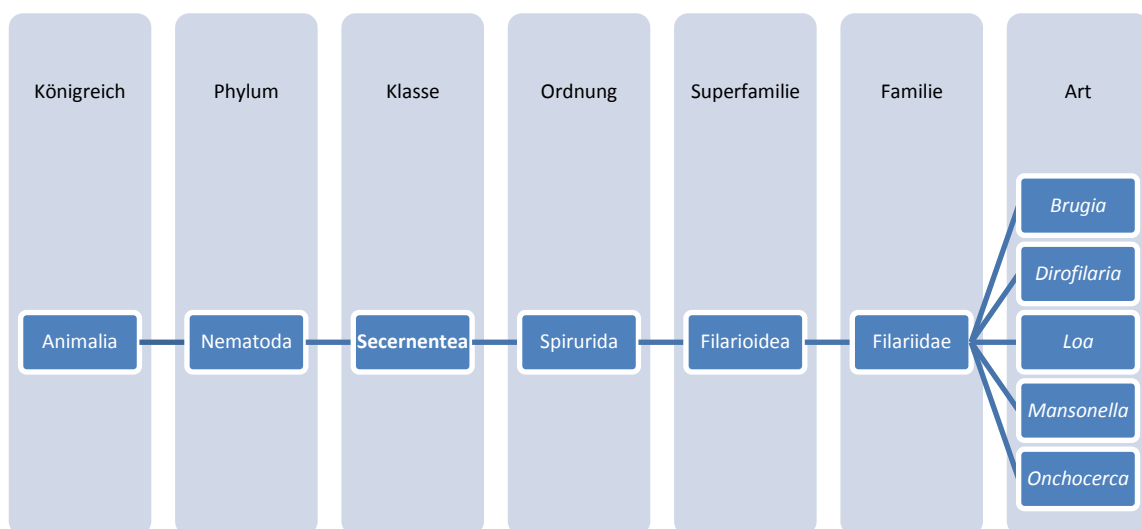


Abbildung 1: Übersicht über die Taxonomie der Filarien

1.1 ALLGEMEINES

Filarien sind fadenförmige Würmer und verursachen eine Vielfalt an Krankheiten, die zum Beispiel in einer lymphatischen Filariose oder in einer Erblindung enden können. Filarien kommen hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten vor, wo sie durch Mücken oder andere Insekten übertragen werden. Die adulten Würmer (Makrofilarien) können eine Länge zwischen 2 und 50 cm erreichen. Sie können in den Lymphgefäßen, im Blut, in der Haut und anderen Geweben bis zu 15 Jahre leben.

Zur Fortpflanzung heftet sich das Männchen an das Weibchen, welches am hinteren Ende eine Art von Vagina mit anschließendem Uterus besitzt (siehe Abb. 2). Anschließend bilden die Weibchen Eier, die im Uterus heranreifen. Wenn das Weibchen die Eier absetzt, enthalten diese die sogenannten Mikrofilarien. Diese Mikrofilarien bleiben entweder von der Eihülle umgeben oder sie schlüpfen aus dieser. Sie können eine Länge von 0,2 – 0,3 mm erreichen und sich im Blut oder in der Haut festsetzen (1), (2).

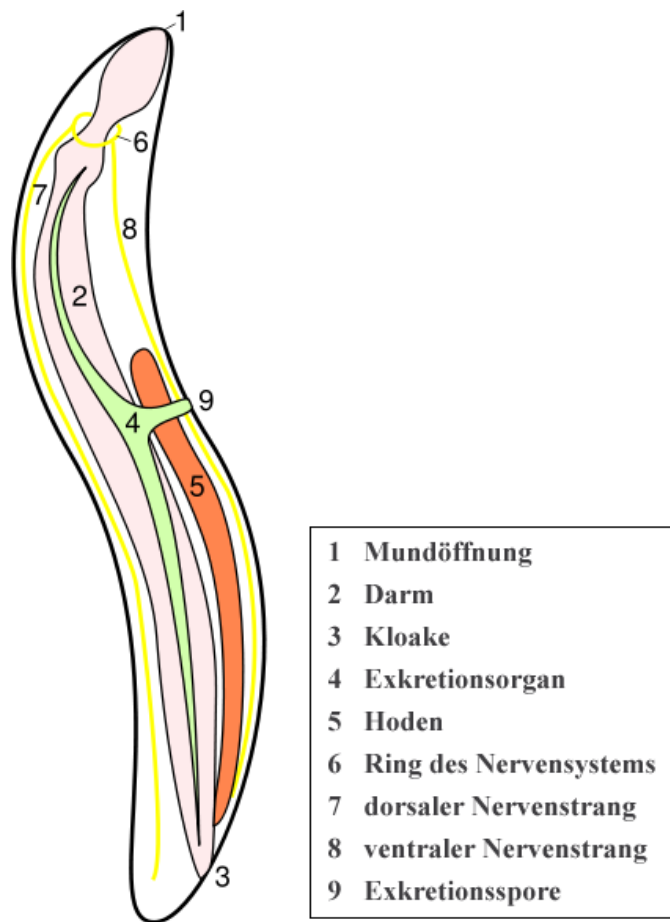


Abbildung 2: Aufbau eines Fadenwurms

1.2 ENTWICKLUNGSZYKLUS

Wie bereits erwähnt, benötigen Filarien für ihren Entwicklungszyklus Insekten (z.B. Mücken) als Zwischenwirte und Überträger.

Die Insekten nehmen die Mikrofilarien durch Saugen an einem bereits infizierten Menschen auf. Die Mikrofilarien entwickeln sich anschließend in der Thoraxmuskulatur des Vektors über 2 Häutungen zu infektiösen Larven, die zu den Mundwerkzeugen wandern und bei einem neuerlichen Stich in die Haut des neuen Wirtes übertragen werden. Im Menschen folgen 2 weitere Häutungen und die Wanderung in das entsprechende Gewebe, wie in Abbildung 3 dargestellt ist (1).

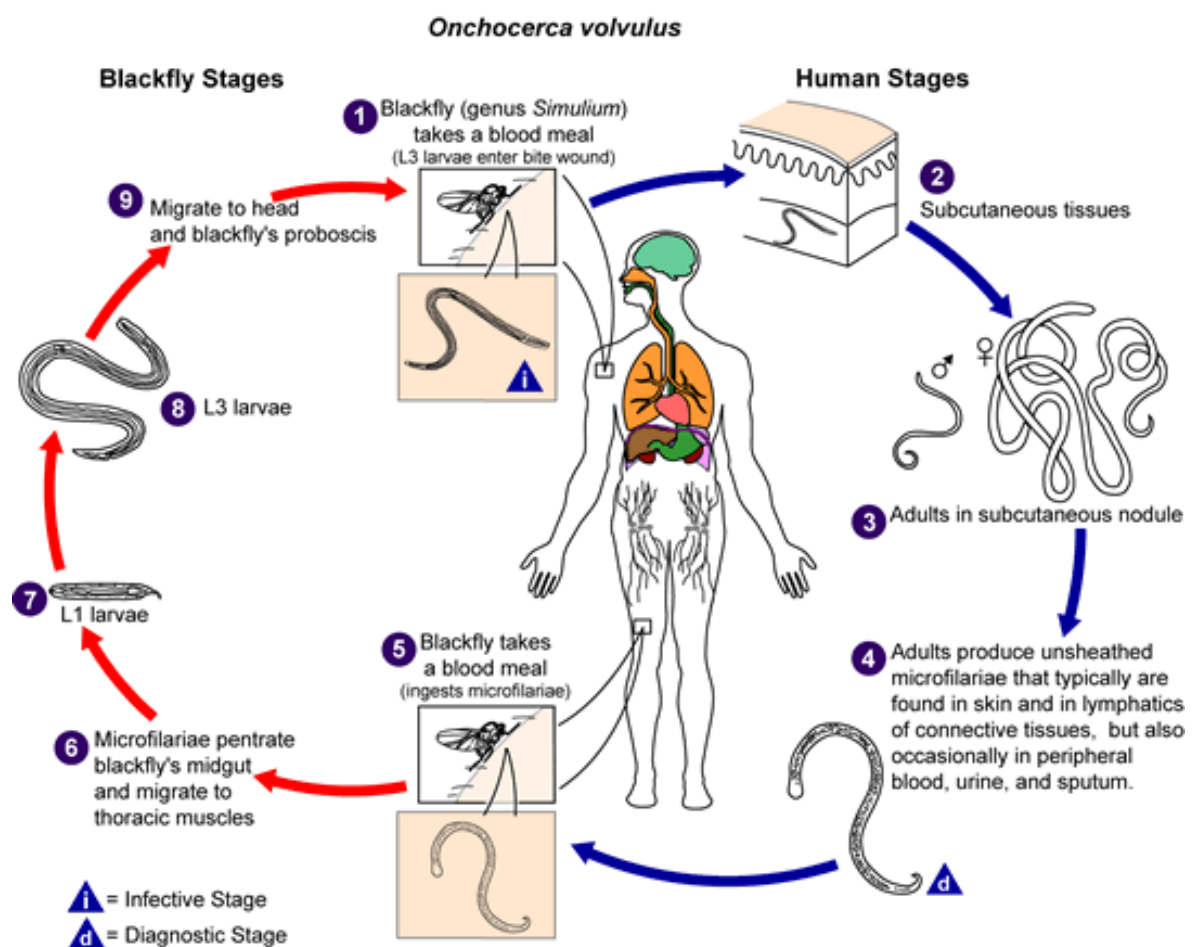


Abbildung 3: Entwicklungszyklus von *Onchocercus volvulus*

1.3 ÜBERBLICK DER ERREGER

Zur Gattung der Filarien gehören verschiedene Arten von Erregern:

- *Wuchereria bancrofti*
- *Brugia malayi*
- *Onchocercus volvulus*
- *Loa Loa*
- *Mansonella* sp. (1)

Die Endosymbionten Wolbachia (siehe Kapitel 2) sind nicht in allen vorhin erwähnten Filarienarten enthalten. Am bekanntesten ist die Symbiose zwischen den Arten *Onchocercus volvulus* und *Wuchereria bancrofti*. Allerdings fehlt der Endosymbiont bei *Loa Loa* und *Acanthocheilonema vitae* (*A.vitae*) (3). Fraglich bleibt, ob dieses Bakterium in diesen Arten generell nicht vorkommt oder ob es im Laufe der Evolution verloren gegangen ist (4).

Art	Verbreitung	Überträger	Lokalisation der Adulten	Mikrofilarien	Pathologie
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Südostasien, Pazifik, trop. Afrika, Karibik, Südamerika	Mücken: Culex, Anopheles, Aedes	Lymphsystem	Bescheidet, Blut: nacht-, tag- oder subperiodisch	Lymphangitis, -adenitis; Elephantiasis
<i>Brugia malayi</i>	Süd- und Ostasien	Mücken: Anopheles, Aedes, Mansonia	Lymphsystem	Bescheidet, Blut: nacht- oder subperiodisch nachtperiodisch	Lymphangitis, -adenitis; Elephantiasis
<i>Onchocercus volvulus</i>	Afrika, Zentral- und Südamerika	Mücken: Simulium	Subkutanes Bindegewebe	Unbescheidet, Haut, nicht periodisch	Hautknoten, Dermatitis, Augenveränderungen
<i>Loa Loa</i>	Tropisches Afrika	Fliegen: Chrysops	Subkutanes Bindegewebe	Bescheidet, Blut, tagperiodisch	Hautschwellungen, Befall der Konjunktiva
<i>Mansonella perstans</i>	Afrika, Südamerika	Mücken: Culicoides	Peritoneal- und Pleurahöhle	Unbescheidet, Blut, nachtperiodisch	Meist apathogen

Tabelle 1: Überblick über Filarienarten und Überträger

1.4 WUCHERERIA BANCROFTI UND BRUGIA MALAYI

Wuchereria bancrofti und *Brugia malayi* sind die Erreger der lymphatischen Filariose.

Es gibt verschiedene Stadien der Erkrankung:

- symptomlose Infektion
- symptomatische Infektion (akut)

Dieses Stadium zeichnet sich durch eine Schwellung der Lymphknoten mit einer beginnenden Entzündung der Lymphbahnen (Lymphangitis) aus. Die Patienten leiden unter rezidivierenden Fieberschüben, Schwellungen der Beine, Arme, Skrotum und Mammae, sowie unter Funikulitis und Orchitis (1).

- symptomatische Infektion (chronisch)

Es kommt zu chronischen bis obstruierenden Veränderungen der Lymphgefäße mit einer Behinderung bzw. Blockade des Lymphsystems und Erweiterung von Lymphgefäßen (Lymphvarizen). Die Behinderung des Lymphabflusses führt zu einer starken Schwellung der Lymphknoten und Extremitäten (Elephantiasis) (1).

- tropische pulmonale Eosinophilie

Bei der tropischen pulmonalen Eosinophilie handelt es sich um eine allergische Reaktion auf Antigene von Filarien. Sie geht mit Husten, Lungenbeschwerden, hohen Bluteosinophiliewerten, Milz- und Lymphknotenschwellungen einher (1).

1.4.1 *WUCHERERIA BANCROFTI*



Abbildung 4: *Wuchereria bancrofti*

Dieser Erreger kommt in Südostasien, Pazifik, tropischen Afrika, in der Karibik und im tropischen Südamerika vor. Die adulten Würmer sind fadenförmig und können eine Länge von 4 cm (Männchen) bis 10 cm (Weibchen) erreichen. Beide Geschlechter halten sich im Bindegewebe, in den

Lymphgefäßen und Lymphknoten auf. Dort legen die Weibchen auch ihre Eier ab, die bereits ausgebildete Larven enthalten (ovovivipar). Aus diesen Eiern schlüpfen später bescheidete Mikrofilarien. Diese kann man frühestens nach 7-8 Monaten im Blut nachweisen. Als Überträger dieser Krankheit fungieren Mücken, wie zum Beispiel Culex, Aedes und Anopheles (5).

1.4.2 BRUGIA MALAYI



Abbildung 5: *Brugia malayi*

Das Vorkommen dieses Erregers reicht vom südlichen Indien, Sri Lanka über Bangladesch bis Südchina und SüdJapan, Malaysia und umfasst die gesamte indonesische Inselwelt sowie die Philippinen. Diese Art ist in ihrer Biologie und Pathogenität der vorigen sehr ähnlich. Die adulten Würmer werden zwischen 2,5 cm (Männchen) und 6 cm (Weibchen) lang. Die bescheideten Mikrofilarien sind etwas kleiner, als die von

Wuchereria bancrofti und werden aufgrund ihres Nachweises im Blut in zwei Gruppen

eingeteilt: in der einen Gruppe kommen die Mikrofilarien hauptsächlich nachts im Blut vor (*Mikrofilaria nocturna*), in der anderen Gruppe zeigt sich ein nahezu aperiodischer Verlauf mit einem flachen mittäglichen Maximum an Mikrofilarien im peripheren Blut. Diese Periodizität ist von Region zu Region unterschiedlich. Nach frühestens 3 Monaten können die Mikrofilarien im Blut nachgewiesen werden. Die Übertragung erfolgt ebenfalls durch Mücken wie Culex, Aedes, Anopheles und Mansonia (1).

1.5 ONCHOCERCUS VOLVULUS

Onchocercus volvulus ist der Erreger der Flussblindheit. Seine Verbreitung beschränkt sich auf das tropische Afrika, Jemen, Mittel- und Südamerika. Sie haben weniger als 1mm Durchmesser und können eine Länge von 4 (Männchen) bis 50 cm (Weibchen) erreichen. Der Mensch stellt den Endwirt für diese Art dar. Einmal im Menschen angekommen,

siedeln sich die Würmer in der Haut an, wo sie schmerzlose Knoten in der Subkutis verursachen. Die Mikrofilarien lösen eine juckende, ekzematöse, hyperpigmentierte



Abbildung 6: Larve eines *Onchocercus volvulus*

Hautreaktion aus. Durch die meist langbestehende Belastung mit Mikrofilarien entwickeln die betroffenen Menschen eine Papier- oder Greisenhaut, die durch die Zerstörung des elastischen Bindegewebes und die chronische allergische Reaktion zustande kommt.

Diese Fadenwürmer wandern auch in die Augen ihres Wirtes ein und lösen eine Reihe von Symptomen bzw. Augenerkrankungen aus. In der vorderen Augenkammer verursachen sie eine Konjunktivitis, Keratitis punctata, Photophobie und ein sekundäres Glaukom. In der hinteren Augenkammer kommt es zu einer Neuritis nervi optici, einer Optikusatrophie und einer Chorioretinitis. Am Ende dieser Erkrankung erblindet der Patient. Überträger dieses Erregers ist die Kriebelmücke (*Simulium damnosum*) (1), (5), (6).

2. DAS BAKTERIUM WOLBACHIA

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem allgemeinen Aufbau des Bakteriums und dessen intrazellulärem Lebensstil. Obwohl dieser Endosymbiont schon seit 1924 bekannt ist, wurde erst in den letzten 10 Jahren intensiv an diesem Organismus geforscht. Durch ein Leben im Wurm und die schwierige Kultivierbarkeit von Rickettsien außerhalb der Wirtszelle, ist es für Forschergruppen äußerst schwer, die wirklichen Lebensumstände dieses Bakteriums aufzuklären. Durch das Aufkommen von molekularbiologischen Untersuchungsmöglichkeiten wie zum Beispiel PCR, 16S rDNA Sequenzscreening, MLST wurde die Aufklärung dieses intrazellulären Lebens wesentlich erleichtert (7).

2.1 GESCHICHTE DER ENTDECKUNG VON WOLBACHIA

1924 wurden erstmals intrazelluläre Bakterien im Mosquito *Culex pipiens* von Hertig und Wolbach gefunden und diese dann 1936 als *Wolbachia pipientis* benannt. In den 1950er Jahren entdeckten Ghelelovitch (8) und Laven (9), dass bei gewissen Kreuzungen wenige bis gar keine Nachkommen entstanden. Laven glaubte, dass diese Inkompatibilität durch die Weibchen übertragen werden musste und nannte dieses Phänomen „zytoplasmatische Inkompatibilität“ (7), (8), (9), (10).

Es dauerte bis in die 1970er Jahre bis Yen und Barr eine Verbindung dieser zwei Phänomene durch das Rickettsium *Wolbachia* fanden (11). Über die nächsten Jahrzehnte wurde diese Inkompatibilität in den verschiedensten Insektenarten gefunden .

Ebenso in den 70er Jahren wurde durch Mc Laren, Vincent et al., Kozek und Figueroa das Vorkommen von intrazellulären Bakterien in verschiedenen Filarien Arten entdeckt. Mc Laren et al., 1975 vermuteten damals, dass diese Bakterien mit *Wolbachia* verwandt sein könnten. Ferner glaubten sie, dass durch die Beteiligung der Bakterien an der Pathogenese von Filariose, ein neuer Therapieansatz entwickelt werden könnte. Diese Entdeckung wurde jedoch von vielen Parasitologen kaum beachtet (12), (13), (14), (15).

Erst in den 90er Jahren wurden durch weitere Forschungen neue Einflüsse der *Wolbachia* auf ihre Insektenwirte bekannt.

Legrand et al., 1987 entdeckten zytoplasmatisch vererbte Faktoren, die eine Feminisierung des Wirtes verursachten (16). Stouthamer et al., 1990 explorierten, dass die weibliche

Pathenogenese in wenigen Strängen von *Trichogramma* Wespen mit Antibiotika geheilt werden konnte (Antibiotika-behandelte Linien kehrten zur Produktion von männlichen Nachkommen zurück) (17).

Den großen Durchbruch erreichte man mit dem Aufkommen von molekularbiologischen phylogenetischen Untersuchungen (PCR, 16S rDNA, MLST etc.) dieses intrazellulären Bakteriums.

Mit diesen Methoden wurde bewiesen, dass zytoplasmatische Inkompatibilität, Feminisierung des Wirtes und Tod von männlichen Nachkommen durch Wolbachia verursacht werden (3), (7).

1995 konnte Sironi mit Hilfe von molekulargenetischen Techniken zeigen, dass eine Verwandtschaft zwischen Wolbachia in *Dirofilaria immitis* (Vorkommen: Hund) und bisher nur in Insekten gefundenen Wolbachia besteht. Somit konnte die Bedeutung von Wolbachia bezüglich Vorkommen in pathogenen Filarien nicht mehr verleugnet werden (12), (18).

In den Jahren 1999 und 2000 wurden zwei Konferenzen für die Entdeckung des Genoms von Wolbachia abgehalten. Als Resultat dieser Konferenzen wurde ein Wolbachia Genom Konsortium initiiert (19).

2.2 EINTEILUNG UND AUFBAU DER BAKTERIE

Wolbachia ist ein gramnegatives, obligat intrazelluläres, maternal vererbtes Bakterium, das zur Klasse der Alphaproteobakterien und zur Ordnung Rickettsiales gehört. Die nächsten Verwandten dieses Endosymbionten sind Rickettsien, Ehrlichien, Cowdrien und Anaplasma (20). Die engsten Anverwandten Wolbachias sind Anaplasma und Ehrlichien, die eine ca. 90% Übereinstimmung bei 16S rRNA Sequenzen zeigen (21), (22).

Das runde Wolbachia Bakterium besitzt einen Durchmesser von ca. 0,5µm und eine dreischichtige Zellwand. Das Cytoplasma beinhaltet Ribosomen-ähnliche Granula (23).

Die Endobakterien findet man in den männlichen und weiblichen Würmern subkutan, bei den Weibchen in den Oocyten, in Embryos und im Larvenstadium, wie in Abbildung 7 ersichtlich ist (20). Sie können in Vakuolen abgekapselt oder einzeln, in kleinen oder großen Gruppen leben (12).

Zurzeit wird die Art *Wolbachia* in sechs taxonomische Supergruppen folgend der Einteilung mittels *ftsZ*¹-basierender Phylogenie unterteilt (24), (25).

Supergruppe A und B findet man nur in Arthropoden, Supergruppe C und D hingegen in Filarien. Der Begriff Supergruppe hat zu einiger Verwirrung geführt, da durch eine Untersuchung des *Wsp*-Gens² eine neue Verknüpfung zwischen den verschiedenen lebenden *Wolbachia* Bakterien gefunden wurde (24).

Zu der Supergruppe C gehören zum Beispiel *Onchocercus volvulus*, *Dirofilaria immitis* und die Verwandten beider Arten. Zur Supergruppe D zählen zum Beispiel *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti* und die Verwandten beider Arten. In die Supergruppe F fallen die Verwandten von *Mansonella ozzardi*. Zu den Supergruppen E, F, G und H können nur wenige Vertreter der Krustentiere, Spinnen, Hexapoden, Termiten und Fadenwürmern gezählt werden (21), (26).

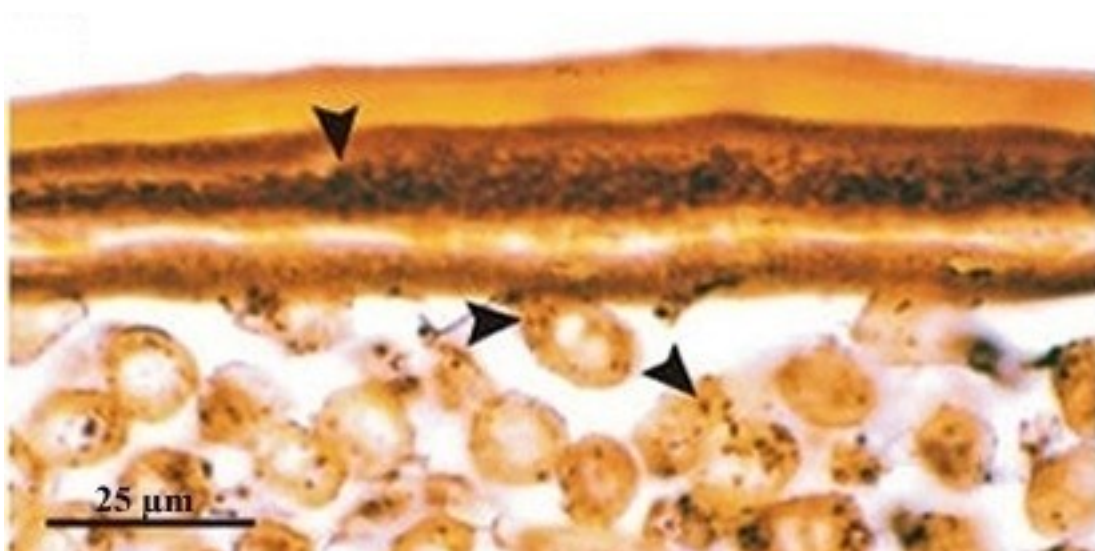


Abbildung 7: *Wolbachia* subkutan & in Oocyten (Pfeile)

¹ Zellzyklus Protein

² *Wolbachia* surface protein

2.3 EVOLUTION/PHYLOGENIE

Die Entdeckung der Verwandtschaft zwischen den Supergruppen hat wichtige Informationen betreffend Evolution und Biologie der Wolbachia in den verschiedenen Wirten erbracht. Studien ergaben, dass die Phylogenien der Supergruppe A und B nicht mit deren Wirt übereinstimmen und somit ein horizontaler Transfer des Bakteriums angenommen wird. Im Gegensatz dazu, findet die Entwicklung der Supergruppe C und D im Einklang mit ihrem Wirt statt. Diese Art von Entwicklung würde eine Abhängigkeit zwischen den beiden Symbionten voraussetzen, die in zahlreichen Studien untersucht wurde (20), (24).

1998 wurden von Bandi et al. ursprünglich vier Supergruppen angenommen, die sich aus Untersuchungen mit *ftsZ* und *16S rDNA* ergaben (siehe Abb. 8). Die Autoren verglichen 10 Arten aus der *Onchocerca* Familie und isolierten 17 Linien des Wolbachia Bakteriums. Die einzige Art ohne Endosymbionten scheint *Acanthocheilonema vitae* zu sein. Es liegt trotzdem an weiteren Forschungen zu entdecken, ob das Bakterium in dieser Art verloren gegangen ist oder sich die Art auf andere Weise entwickelt hat (wenn man annimmt, dass *A.vitae* mit *Onchocerca* verwandt ist). Die Studie hat ebenso gezeigt, dass

- Wolbachia in neun von zehn Arten der *Onchocerca* Familie gefunden wurde
- Wolbachia von verschiedenen Arten und verschiedenen Lokalisationen, ähnliche oder fast identische *ftsZ* DNA Sequenzen zeigen
- die Entwicklungen beider Symbionten übereinstimmen
- Wolbachia vier Supergruppen hat
- die Verwandtschaft zwischen diesen Gruppen nicht vollständig mittels *ftsZ* und *16S rDNA* aufschlüsselbar ist (25)

Bandi et al. glaubten, dass Wolbachia in Filarien durch einen vertikalen Transfer weitervererbt werden könnten und dass diese Bakterien von *Litomosoides* auf *Brugia* und *Wuchereria* übergegangen sind. Überdies ergab die Studie, dass Filarien wahrscheinlich keine Rolle beim horizontalen Transfer von Wolbachia in Arthropoden eine Rolle spielen. Davon abgesehen muss vor ca. 100 Millionen Jahren eine der beiden Möglichkeiten stattgefunden haben: Entweder die Bakterien wurden von Arthropoden auf Nematoden übertragen oder das Bakterium hat sich selbstständig in den Nematoden entwickelt. Zweiteres jedoch verlangt nach einem neuen Wirt, da Wolbachia die Fähigkeit zum intrazellulären Leben schon weit vor 100 Millionen Jahren erlangt haben soll (25), (27).

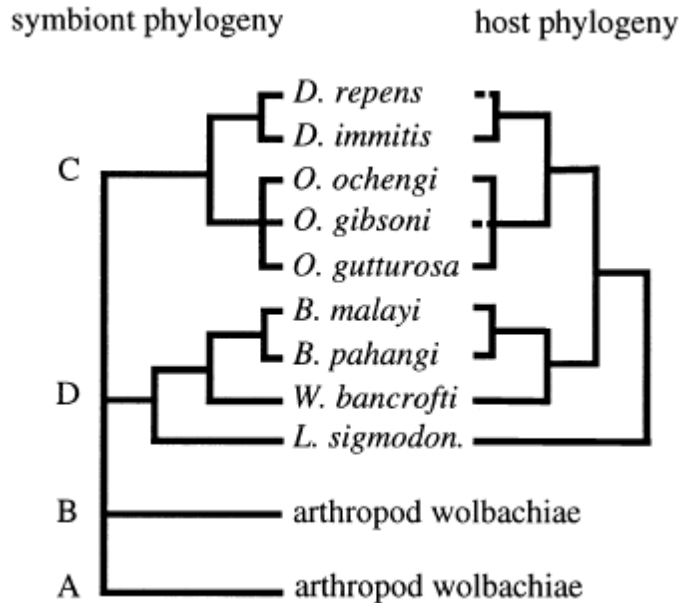


Abbildung 8: Vergleich zwischen Wolbachia und Filarienphylogenie. Der linke Teil basiert auf *ftsZ* und *16S rDNA* Analysen. Der rechte Teil stellt die Filarienphylogenie dar. A-D sind die ursprünglich bekannten Supergruppen.

Trotzdem bleibt unklar, welche Effekte ursprünglich sind, welche sich entwickelt haben, welches Tier dieses Bakterium als Erstes befallen hat, und wie Wolbachia von den Arthropoden auf die Filarien übergegangen ist (24).

Im Jahre 2000 versuchten Bazzocchi et al. eine neue Untersuchung zur Aufdeckung der Verwandtschaften zwischen den Supergruppen. Die Autoren testeten acht Arten von Filarien auf die Sequenzen, die für Gene des *Wsp* Oberflächenproteins von Wolbachia kodieren. Die Studie ergab keine wesentlichen neuen Ergebnisse, außer einer Bestätigung von vorhergehenden Studien basierend auf *ftsZ* Untersuchungen. Außerdem wurde eine weit geringere Variabilität an Arten von Wolbachia in Filarien entdeckt, als sie in Arthropoden herrscht. Trotzdem kamen die Forscher zu dem Schluss, dass die Verwandtschaftsverhältnisse der Supergruppen mit *Wsp* Sequenzen alleine nicht lösbar sind (28).

Baldo et al., 2007 konnten zeigen, dass *Wsp* durch genetische Rekombinationen innerhalb der Supergruppen und durch Fehler in früheren Untersuchungen der Supergruppen A und B für die Aufklärung der Beziehungen zwischen den Supergruppen ungeeignet ist (29).

Untersuchungen mittels hypervariablen Regionen im Genom von Wolbachia zeigen, dass das *Wsp* Protein für die Erforschung der Wolbachia Evolution ungeeignet ist, da dieses Protein sehr viele genetische Rekombinationen über horizontalen Gentransfer und

Veränderungen zwischen den Genen erfahren hat. Die Mechanismen für den Austausch von DNA sind bis heute noch unbekannt, dennoch gibt es einen Ansatz hinsichtlich mehrfacher Infektion des Wirtes und im Zuge dessen Austausch von DNA (30).

2002 konnten Lo et al. zwei neue Supergruppen durch *ftsZ*-Untersuchungen und *16S rDNA* Vergleichstest differenzieren. Diese Entdeckungen sind ausschlaggebend, da

1. die Supergruppen Differenzen in ihrer DNA aufweisen
2. spezielle Wolbachia Gruppen in Arthropoden oder Filarien durch gezielte Primer-Wahl gefunden werden können
3. besseres Verstehen der Interaktionen zwischen Wolbachia und Wirt erfolgen kann
4. das ursprüngliche intrazelluläre Bakterium gefunden werden kann.

Es konnten noch keine Wechselwirkungen in den Supergruppen E und F zwischen den Symbionten gefunden werden (24).

Multi Locus Sequence Typing von fünf Genen des Wolbachia Genoms wurde von mehreren Studiengruppen versucht, mit dem Ergebnis, dass regelmäßige Rekombinationen sowie eine große Artenvielfalt zwischen den verschiedenen Wolbachia Stämmen entdeckt wurden. Regelmäßige Rekombinationen legen die Annahme nahe, dass alle Wolbachia zu einer Spezies gehören (21). Außerdem stellen die Forscher in ihrer Studie die durch *Wsp* Sequenzen neu entdeckte Supergruppe G in Frage. Sie vermuten, dass die damals verwendeten Vertreter zur Supergruppe A gehören, aber einen veränderten rekombinanten *Wsp* Haplotyp besitzen (29).

2005 konnten Casiraghi et al. einen weiteren Vertreter der Supergruppe F identifizieren. Sie bewiesen, dass das Wolbachia Bakterium von *Mansonella* sp. ein Mitglied der Supergruppe F sein muss, zusammen mit den *Wolbachia* sp. von Termiten. Diese Entdeckung konnten sie durch die Analyse von einem Hitzeschockprotein und von Proteinen, welche für den Citratzyklus und die Zellteilung verantwortlich sind, ableiten. Aus diesen Ergebnissen schließt die Forschergruppe, dass ein Gentransfer zwischen den beiden Spezies nicht vor ca. 100 Millionen Jahren (wie zwischen Supergruppe A und D angenommen), sondern erst viel später stattgefunden haben muss (31).

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass in der DNA von Nematoden auch Insertionen von Wolbachia DNA vorkommen können. Inwiefern diese Veränderungen eine Rolle bei der Evolution von Wolbachia spielen ist unklar, da diese Fragmente anscheinend nicht kodierend sind (32).

Abschließend muss hier noch festgehalten werden, dass es eine Uneinigkeit zwischen den verschiedenen Forschungsgruppen betreffend der Benennung von Wolbachia gibt. Im August 2004 wurde beschlossen, dass alle Wolbachia Bakterien, die zu den Supergruppen A-H gehören und alle eng verwandten Bakterien als *Wolbachia pipientis* bezeichnet werden (siehe Abb. 9). Ansonsten würde die jeweils einzelne Benennung von jeder neu entdeckten Bakterienart zu einer Unmenge an spezifischen Namen führen (21).

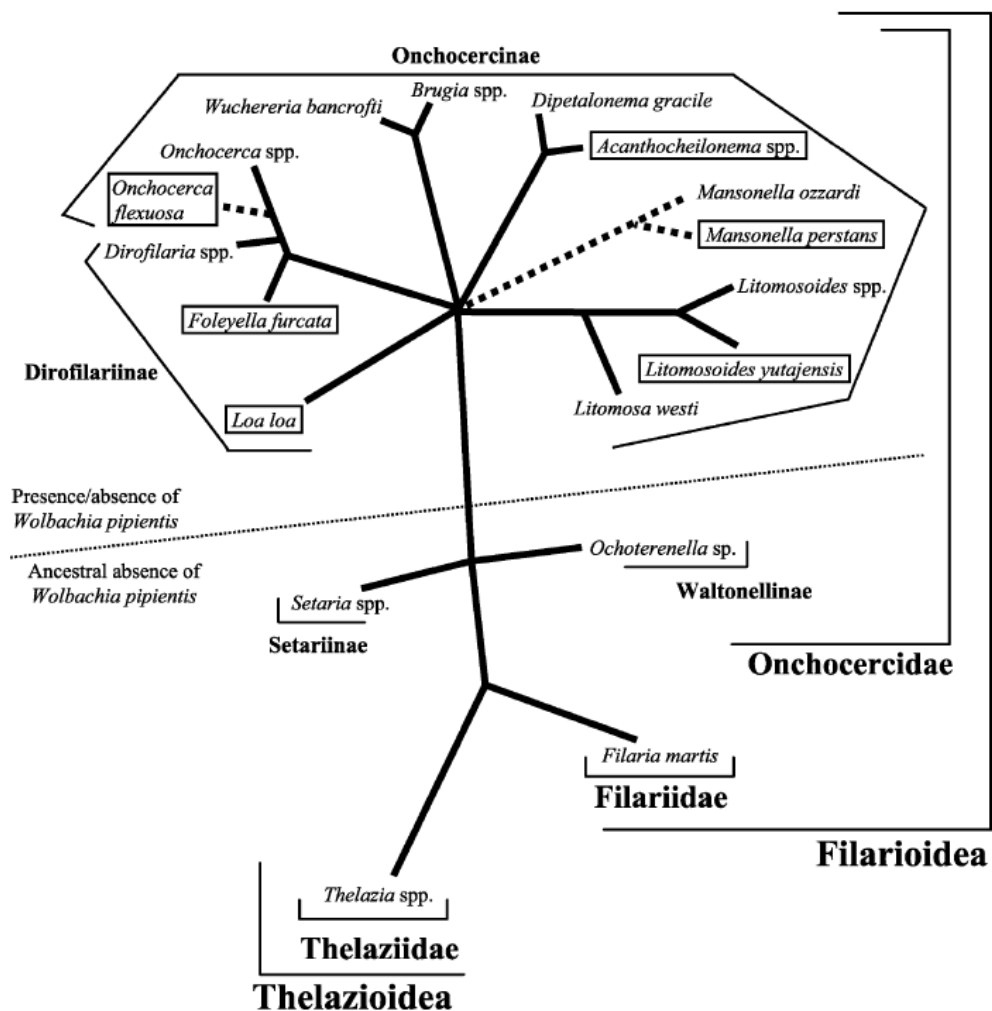


Abbildung 9: Vermutetes Vorkommen von Wolbachia in Filarien

2.4 GENOM, BIOCHEMIE

2005 konnten Foster et al. das komplette Genom von Wolbachia in *Brugia malayi* entschlüsseln. In dieser Studie vergleichen die Autoren das Genom von wBm (Wolbachia von *Brugia malayi*) mit dem Genom von Wolbachia in *Drosophila melanogaster*, dessen Bakterium ausschließlich parasitisch lebt. Dabei konnten sie feststellen, dass der Endosymbiont eventuell Nährstoffe und andere Substrate seinem Wirt, also dem Wurm, zur Verfügung stellen kann (20), (33).

Das Genom von wBm ist 1,1 Mbp groß (siehe Abb. 10). Die Genomgröße von Supergruppe A und B (1,4-1,6 Mbp) (24), ist kleiner als das in *Drosophila melanogaster*, aber größer als das von Mykobakterien. Die geringe Größe legt die Annahme nahe, dass das Wolbachia Bakterium aufgrund des langen Zusammenlebens mit dem Wurm, einige Gene verloren hat und nur mehr die für sich notwendigsten Gene besitzt: Beispielsweise hat es alle Gene verloren um Aminosäuren zu synthetisieren (ausgenommen eine), um neue Wirte zu bevölkern und um das Immunsystem des Wirtes zu befallen. Ebenso fehlen ein paar Gene um DNA Schäden zu beheben und die RNA zu modifizieren (20).

wBm kann keine Lipopolysaccharide herstellen, die es zum Aufbau der eigenen Zellmembran benötigt. Weiters kann das Bakterium das Grundgerüst für Peptidoglykane nicht selbst synthetisieren. Die Wolbachia Peptidoglykane ähneln den Zytotoxinen von *Neisseria gonorrhoeae* und *Bordetella pertussis*, die aus Muraminpeptiden bestehen (können Immunsystem über TLR 2 stimulieren) (20).

Natürlich hat der Endosymbiont auch einige Gene behalten. Gene zur Herstellung von Riboflavinen, Flavinadenindinucleotiden, Häme, sowie Gene zur Synthese von Glutathion und aller Nukleotide, kommen in dem Bakteriengenom vor (20).

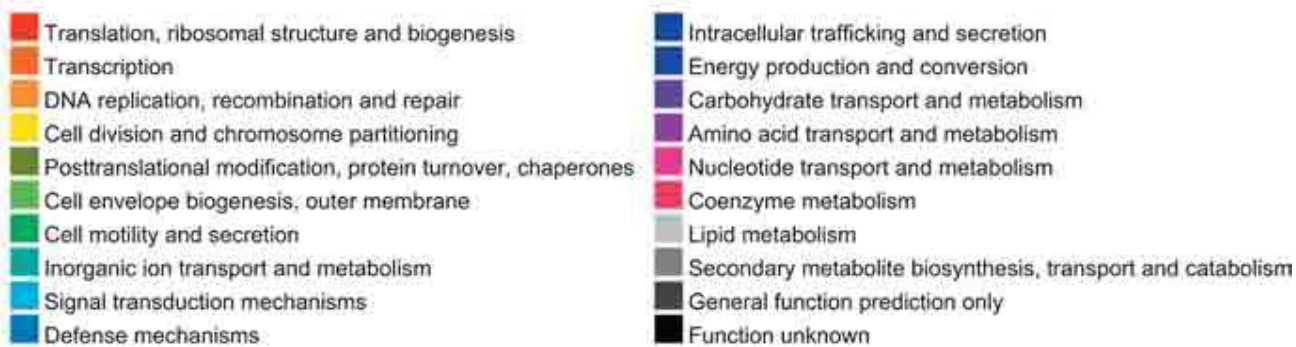
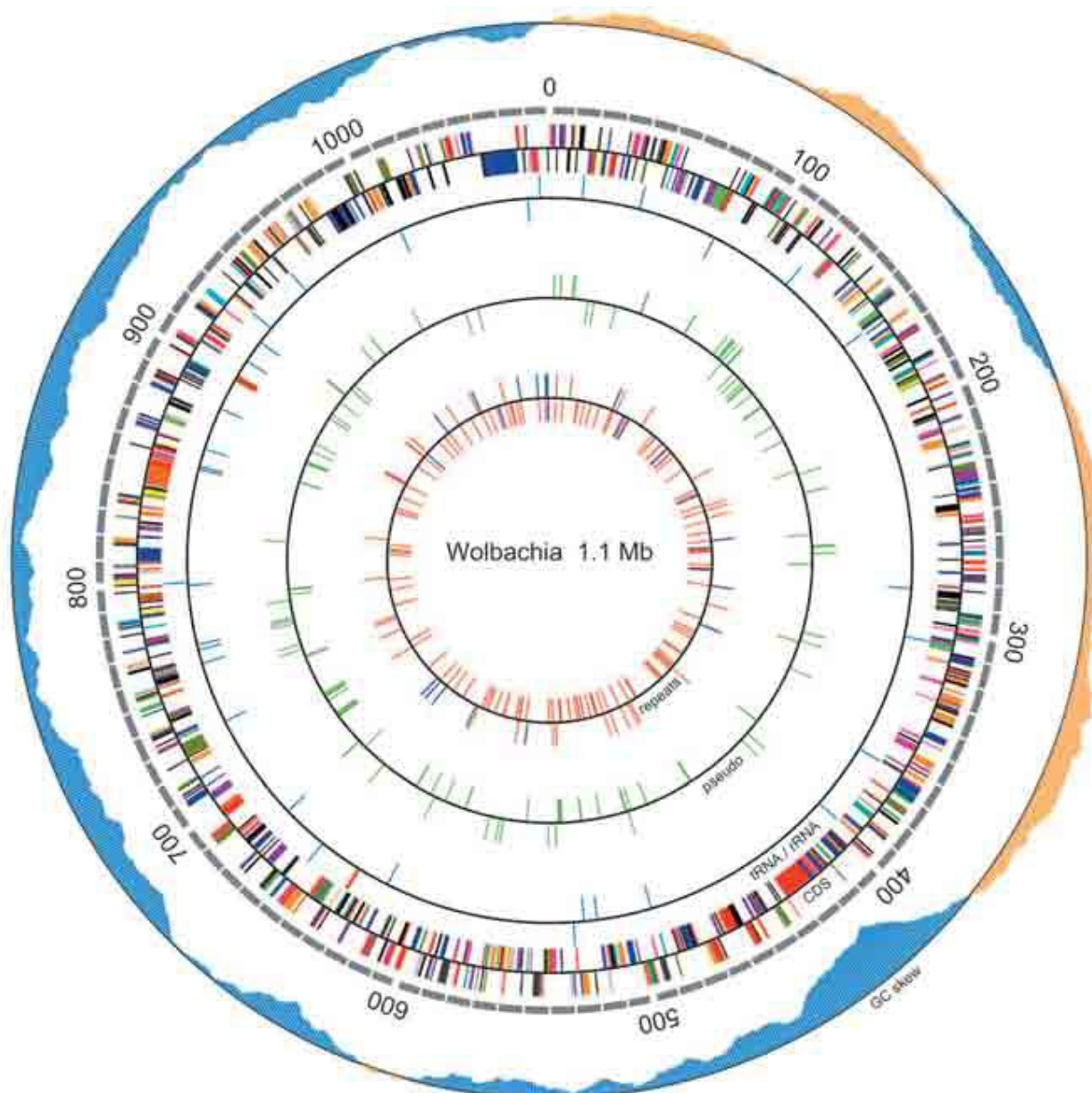


Abbildung 10: Das Genom von Wolbachia

3. DIE SYMBIOSE ZWISCHEN WOLBACHIA UND FILARIEN

Seit den 70er Jahren wurde Wolbachia in zahlreichen Filarien entdeckt und untersucht. Dazu gehören die wichtigsten Vertreter wie *Onchocercus volvulus* und *Brugia malayi*. Das Bakterium scheint über das Weibchen transovariell vererbt zu werden und kommt in hoher Anzahl in Filarien vor. Die Symbiose zwischen diesen beiden Arten ist von steigender Bedeutung, da Stoffwechselprodukte des Bakteriums einen immunologischen Stellenwert besitzen und da die Bakterien und die Interaktionen zwischen Bakterium und seinem Wirt eine neue Therapieoption darstellen könnten. Deshalb ist es sehr verwunderlich, dass seit den 70er Jahren keine weiteren wesentlichen Forschungen durchgeführt wurden (34). In diesem Kapitel wird versucht, eine Verbindung zwischen den beiden Symbionten herzustellen und zu zeigen, dass diese Symbiose durchaus für beide Seiten Vorteile bringt und Wolbachia nicht als reiner intrazellulärer Parasit abgetan werden kann.

3.1 STOFFAUSTAUSCH

Wolbachia in *Brugia malayi* (33) besitzt Gene für ein Typ IV Sekretionssystem, das von intrazellulären Bakterien zum Export von Molekülen aus der Zelle in den Wirt benutzt wird. Aufgrund dessen, nimmt man an, dass die oben erwähnten Metaboliten von Wolbachia (siehe Kapitel Genom/Biochemie) in den Wurm exportiert werden könnten (siehe Tab. 2). Für diese Theorie spricht die Tatsache, dass die Filarie keine Gene für die Riboflavine und Häm Synthese besitzt. Zudem könnten Häme für die Embryogenese im Wurm eine wichtige Rolle spielen, da die Verschmelzung und die Embryogenese von einem Ecdysteroid-ähnlichen Hormon gesteuert werden – Häme werden für die Synthese dieses Hormons benötigt. Folglich kann durch die Eradikation von Wolbachia die Produktion dieses Hormons und die Embryogenese des Wurmes gestört werden (20).

Auch die vom Bakterium synthetisierten Nukleotide könnten zur Embryogenese des Wurmes beitragen (20).

Glutathion kann von Wolbachia ebenso zur Verfügung gestellt werden, um den Wirt vor zu viel oxidativem Stress durch Sauerstoff-reaktive Zellen des Immunsystems des Wurmwirtes zu schützen (20), (35).

Durch den Verlust der Gene ist bei Wolbachia die endogene Aminosäureproduktion äußerst eingeschränkt, weshalb das Bakterium Aminosäuren zur Protein- und Energie-Produktion über den Tricarboxylsäurezyklus und die Gluconeogenese des Wirtes importieren muss.

wBm Stoffwechsel	Physiologie	Mögliche Tetracyclin Auswirkungen
Riboflavin und Flavin Adenindineucleotide	Essentielle Coenzyme; B.malayi hat keine eigenen Gene	Wachstumshemmung
Häm Synthese	Cytochrom, katalysiert Synthese von Steroid Hormon	Späte Verschmelzung oder Abort, späte Reifung
Nucleotide	Unterstützung für Wirtsnucleotide	Unterbrechung der Oogenese und Embryogenese
Glutathion	Schutz vor oxidativen Stress, ev wichtig für Wirtsschutz	Fehler in der Entwicklung

Tabelle 2: wBm Stoffwechselprodukte, deren mögliche Auswirkungen auf *Brugia malayi* und die Wirkungen einer Tetracyclin Therapie

3.2 WOLBACHIA BEEINFLUSST DIE FORTPFLANZUNG

Da Wolbachia seine parasitären Gene verloren hat und sich vollständig an die intrazelluläre Lebensweise angepasst hat, muss es seine Weitergabe durch verschiedene Tricks sichern. Es wurden eine Reihe von Mechanismen entdeckt, die sich Wolbachia zur Beeinflussung der Fortpflanzung seines Wirtes zunutze macht (siehe Tab. 3).

In Arthropoden können diese Bakterien zur zytoplasmatischen Inkompatibilität, Pathenogenese, Feminisierung und Töten von männlichen Nachkommen führen. Wolbachia in Filarien hingegen sind notwendig für die Embryogenese, für die Entwicklung der Larve und für das Überleben der weiblichen erwachsenen Würmer (22).

Wolbachia wird vertikal, d.h. von einer Wurmgeneration auf die nächste übertragen. Es kommt in allen Entwicklungsstadien des Wurmes vor. Dies spricht für die Annahme, dass das Bakterium vom Wurm bei der Entwicklung und Fortpflanzung ebenso benötigt wird, wie das Bakterium den Wurm benötigt (22).

Unklar bis heute ist, wie Wolbachia in die Oocyte gelangt. Man nimmt an, dass Wolbachia in einem gewissen Bereich des Wurmes liegen, welcher sich in der Nähe der Stammzellen und der sich teilenden Zellen befindet, so dass die Bakterien leicht in die neuen Zellen transportiert werden können. Trotzdem bleibt diese Frage unklar, da Wolbachia angeblich alle parasitischen Gene zum Befall einer Zelle verloren hat (22).

Wirt	Symbiose	Weitergabe	Phenotyp, Funktion	Lokalisation
Arthropoden	Überwiegend parasitisch, in wenigen Fällen Mutualistisch	Vertikal und horizontal (selten)	Zytoplasmatische Inkompatibilität, Töten der männlichen Nachkommen, Parthogenese, Feminisierung, Oogenese	Ovarien, Hoden, Embryos, Körperhöhlen
Nematoden	Mutualismus	Nur vertikal	Notwendig für Embryogenese, Larvenentwicklung, Überleben der adulten Würmer	Ovarien, Embryos, Hypodermis

Tabelle 3: Unterschiede im Wolbachiovorkommen zwischen Nematoden und Arthropoden

3.3 INTERAKTION VON WOLBACHIA MIT IMMUNSYSTEM

In zahlreichen Studien wird gezeigt, inwiefern die Symbiose das Immunsystem des Menschen zu beeinflussen versucht. Trotzdem konnte bis heute nicht eindeutig bewiesen werden, ob und inwieweit das Bakterium oder der Wurm an einer Reaktion oder einer fehlenden Reaktion unseres Immunsystems beteiligt ist.

Onchocercus volvulus

Brattig et al., 2000 versuchten in ihrer Studie den Effekt von Lipopolysaccharid-ähnlichen Molekülen von Wolbachia auf unsere Monocyten/Makrophagen zu enthüllen. Sie gehen von einer chronischen Infektion mit *Onchocercus volvulus* aus, die eine geringe bis fehlende Reaktion unseres Immunsystems durch fehlende Stimulation der verschiedenen T-Zellen verursacht. Makrophagen bzw. Monocyten gelten als Bindeglied in der Immunreaktion, da sie Antigene an ihrer Oberfläche den T-Zellen als fremd präsentieren können (APC-Zellen: Antigen-presenting cells). Dafür besitzen sie spezielle Moleküle an ihrer Oberfläche z.B. HLA-DR oder CD80, CD86. Weiters können Monozyten durch gezielte Freisetzung von Interleukinen (z.B. IL-12 und IL-10) T-Zellen anlocken und die Art der Immunreaktion steuern (entweder Th1 oder Th2 Zellen). Als dritte Möglichkeit können Monozyten, ein eingedrungenes Antigen durch Freisetzung von Radikalen und Toxinen selbst bekämpfen (36).

Die Studie von Brattig et al., 2000 kommt zu dem Ergebnis, dass *Onchocercus volvulus* die humanen Monocyten durch Reduktion der Expression von diesen speziellen Oberflächenmolekülen (HLA-DR, CD80, CD86) beeinflusst und das immunsuppressive Zytokin IL-10 und TGF- β (37) freisetzt (siehe Abb. 11). Die Reduktion der Expression, möglicherweise durch Lipopolysaccharide verursacht, wird in Wolbachia vermutet. Durch den Nachweis von Antikörper gegen Hitzeschockproteine von Wolbachia, und von Katalase im Serum infizierter Personen, wird angenommen, dass Wolbachia an der Wirt-Wurm Reaktion beteiligt sein könnte. Ferner konnte eine Häufung von neutrophilen Granulozyten um den Wurm und in den Wolbachia-reichen Gebieten, wie in Tabelle 4 ersichtlich, festgestellt werden (36), (38).

Eine Infektion der Cornea mit Mikrofilarien von *Onchocercus volvulus* kann durch die Stimulation der Fibroblasten zur Absonderung von Chemokinen und zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten führen. Diese Neutrophile lagern sich an die absterbenden Filarien und phagozytieren die Bakterien, wobei sie Chemokine und proinflammatorische

Cytokine abgeben. Diese Reaktion lockt weitere Entzündungszellen an, die zusätzliche Entzündungsmediatoren, Sauerstoffradikale und zytotoxische Stoffe abgeben können. Durch diese Reaktion schädigen sie nicht nur Wolbachia sondern auch die eigenen empfindlichen Korneazellen, die daraufhin absterben. Dies führt zu einer weiteren Verschlechterung der Sehkraft (38).

Eine weitere Studie von Gillette-Ferguson et al., 2007 konnte zeigen, dass die Immunreaktion bei Keratitis nicht über TLR 4 oder 9, sondern mithilfe von TLR 2 abläuft. TLR 2 soll eine wesentliche Rolle bei der Stimulierung von Neutrophilen und bei der Entwicklung einer Linsentrübung einnehmen. Weiters regt TLR 2 die bereits ansässigen Immunzellen zur Produktion von CXC Chemokinen³ an. Dabei ist der Auslöser für diese TLR 2 mediierte Reaktion noch unklar. Es wird vermutet, dass das *Wsp* Protein⁴ von Wolbachia einen möglichen Einfluss auf TLR 2 haben könnte, da es in mit Mikrofilarien infiziertem Kornealgewebe nachgewiesen wurde (39).

Eine Weiterführung dieser Studie durch Daehnel et al., 2007 zeigte, dass TLR 2 maßgeblich als Mediator der Entzündungsreaktion in Frage kommt: erstens moduliert die Aktivierung von dendritischen Zellen (tragen TLR 2 Rezeptor) die Th1 Antwort; zweitens aktiviert TLR 2 die bereits in der Kornea vorhandenen Immunzellen - diese werden zur Produktion von CXC Chemokinen angeregt und locken in weiterer Folge neutrophile Granulozyten an. Aufgrund dieser Entdeckungen nehmen die Forscher an, dass nur Produkte von Wolbachia eine solche Immunreaktion auslösen können (40). Das Zusammenspiel von regulierenden Zellen und Effektor-Zellen ist in Tab. 4 beschrieben.

Für die meisten Immunreaktionen, die von *Onchocercus volvulus* ausgelöst werden, sind absterbende Filarien oder Mikrofilarien die Hauptursache. Es gibt aber auch eine hyperreaktive Form der Immunantwort, die sogenannten „Sowda“ (41). Das Immunsystem kann Mikrofilarien in der Haut des Menschen bis auf 10% limitieren, aber mit ernststen Folgen hinsichtlich Hautschädigung. Patienten leiden unter der schwersten Form der Dermatitis. Ein hoher Spiegel an eosinophilen Granulozyten kann als Spätfolge eine eosinophile kardiale Fibrose verursachen (41).

³ Eine Gruppe von Cytokinen, haben einen anti-angiogenetischen oder einen pro-angiogenetischen Effekt

⁴ *Wsp* kann neutrophile Granulozyten an der Apoptose hindern (39)

Ebenso wurden Menschen gefunden, die trotz Exposition keine Infektion aufwiesen. Diese sogenannten „Immunen“ zeigten im Gegensatz zu Infizierten eine sehr große Anzahl an mononuklearen Zellen im Blut und einen Anstieg von IFN- γ und IL-5 (37).

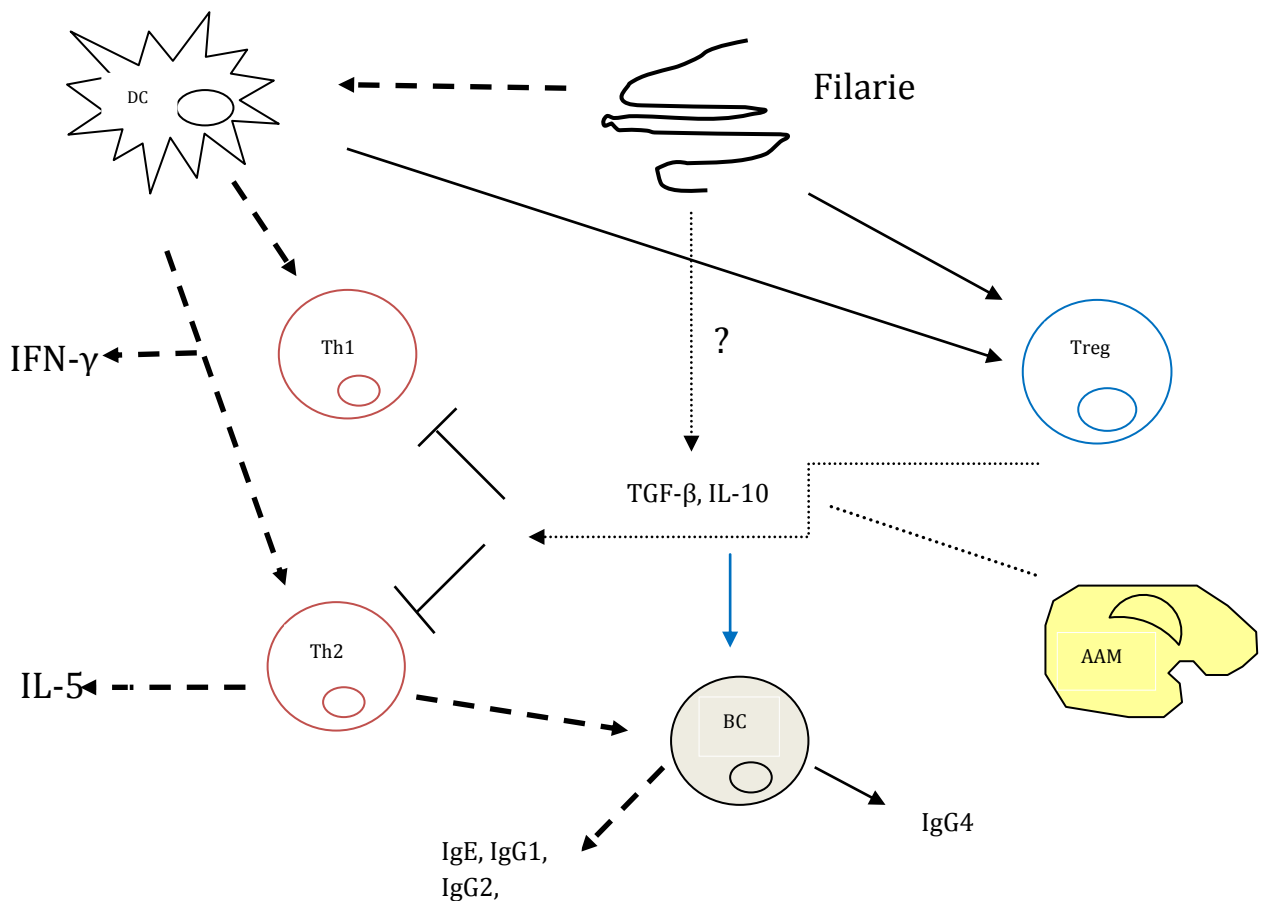


Abbildung 11: Immunmodulation von Filarien

Die unterbrochene Linie beschreibt die proinflammatorische Reaktion, die durchgehende Linie die antiinflammatorische Reaktion; wenn der proinflammatorische Weg nicht supprimiert wird, kommt es zu einer weiteren Aktivierung von Eosinophilen und Granulozyten (nicht am Bild). TGF- β und IL-10 der T-regulatorischen Zellen können die Expression von Th1 und Th2 Zellen herabsetzen und gleichzeitig die B-Zelle zur Produktion von IgG4 anregen.

AAM – alternatively activated Macrophages: Makrophagen, die im Zuge der Abwehrreaktion auch immunsuppressive Faktoren freisetzen z.B. TGF- β und IL-10 (41)

DC: Dendritic cells

	Pro-inflammatroische Mediatoren	Anti-inflammatorische Mediatoren
Regulierende Zellen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Th2, Th1 ▪ Makrophagen ▪ Mastzellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Th3 ▪ Zusätzlich aktivierte Makrophagen
Regulierende Moleküle	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-5, IL-4, IL-13 ▪ IFN-γ ▪ TNF-α, IL-8, IL-12 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IL-10, TGF-β ▪ IL-4
Effektor-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> ▪ B-Zellen ▪ Eosinophile, Neutrophile ▪ Makrophagen, Mastzellen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ B-Zellen ▪ Zusätzlich aktivierte Makrophagen
Effektor-Moleküle	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IgG1, IgG3, IgE ▪ MBP⁵, EDN⁶, ECP⁷ ▪ Peroxidase ▪ Defensin ▪ Sauerstoff und Stickstoffradikale ▪ Proteasen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ IgG4, polyklonales IgE

Tabelle 4: Filarie und Endosymbiont lösen eine Reihe an pro- und antiinflammatorischen Reaktionen aus

⁵ Major Basic Protein

⁶ Endothelin

⁷ Eosinophil cationic Protein

Wuchereria bancrofti und Brugia malayi

Die Immunreaktion des Menschen durch *Wuchereria bancrofti* und *Brugia malayi* betrifft hauptsächlich Erkrankungen im Lymphsystem. Durch die Anwesenheit der Filarien kommt es zu einer Erweiterung der Lymphgefäße, jedoch zu keiner entzündlichen Reaktion. Das Absterben der Würmer, nach vielleicht schon jahrelang bestehender Infektion oder durch eine Therapie, führt zu einer akuten Lymphangitis. Aufgrund der Erhöhung von TNF- α kommt es zu Fieber, wobei die granulomatöse Entzündungsreaktion lokal zu Hautveränderungen führen kann (42).

Das Risiko einer akuten Immunreaktion in einen chronischen Prozess überzugehen, steigt bei Menschen, die häufig akute Lymphangitiden durchmachen. Der chronische Prozess ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von verschiedenen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α) und durch die Erhöhung von verschiedenen systemischen Parametern wie z.B. IL-6, -8 (43). Das Spektrum der Erkrankungen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Wolbachia spielt durch das ständige Vorkommen im Lymphgewebe, z.B. bei Absterben von Würmern, bei fehlerhafter Entwicklung von L3 zu L4 Larven oder bei Geburt einer Mikrofilarie, eine konstante Rolle bei chronischen Prozessen (siehe Abb. 12). Durch die Freisetzung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Mediatoren wird zwar ein durch LPS-induzierter Endotoxinschock abgewendet, doch ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage eine sekundäre Infektion abzuwehren (43).

Auf zellulärer Ebene kann ein Aussetzen gegenüber LPS zu einer Toleranz des Immunsystems führen. Diese Toleranz konnte in Studien noch nicht vollständig erforscht werden. Es wird angenommen, dass diese LPS-Toleranz zu einer abgeschwächten Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und zu einer schwächeren TLR 4 Expression führt, was wiederum den Weg für eine sekundäre Infektion ebnet (43).

Untersuchungen zeigten eine TLR 2/TLR 6 abhängige Immunreaktion auf Filarien mit Wolbachia, jedoch keinerlei Immunreaktion auf Filarien ohne Endosymbionten. Dies legt die Annahme nahe, dass das Bakterium eine wichtige Rolle hinsichtlich Entwicklung einer Entzündungsreaktion einnimmt. Es stellt sich die Frage, warum das Immunsystem nicht auf den Wurm reagiert. Es wird vermutet, dass Filarien spezielle immunsuppressive Substanzen sezernieren, die sie sozusagen unsichtbar gegenüber dem Wirt machen. Diese Annahme wird durch Beobachtungen unterlegt, bei der man keinerlei klinische Symptome

bei infizierten Personen feststellen konnte. Eine andere Theorie stützt sich auf die Entdeckung der Substanz ES-62 (von *Acanthocheilonema vitae*, einer bakterienfreien Filarie freigesetzt), die über TLR 4 Stimulation einen immunsuppressiven Effekt auslöst (44).

Diese Hypothese wird jedoch durch eine neuere Studie, in der Mäuse zwei *Onchocercus volvulus* Proteinen ausgesetzt wurden, widerlegt. Die Forschergruppe konnte beweisen, dass ES-62 keine Immunsuppression und keine Modulation der Immunantwort bewirkt (45).

Weiters konnten andere immunsuppressive Faktoren von Filarien gefunden werden: So besitzen Phosphorylcholine inhibitorische Wirkungen auf T-Zellen, die das Immunsystem vom Wurm ablenken. Auch weisen Cytokin-ähnliche Mediatoren wie TGF- β und Makrophagen-inhibitorische Faktoren einen immunsuppressiven Einfluss auf (46).

	Infektion	Chronisch	Endemisch normal/immun
Klinische Symptome	Nein	Ja	Nein
Aktive Erkrankung (CFA)	Ja	Nein (+/-)	Nein
Immunreaktion Phänotyp:			
a. T-Zell Proliferation	Niedrig	Hoch	Hoch
b. IFN- γ	Niedrig	Hoch	Hoch
c. IL-10	Hoch	Niedrig	Niedrig
d. IgG1, 2	Niedrig	Hoch	Hoch
e. IgG4	Hoch	Niedrig	Niedrig
f. Ab gegen MF Hülle	Nicht vorhanden	Vorhanden	Vorhanden
g. Ab gegen Filarien-Kohlenhydrate	Niedrig	Hoch	Hoch

Tabelle 5: Spektrum an Erkrankungen mit *Wuchereria bancrofti*; CFAs (circulating filarial antigens) können noch nicht nachgewiesen werden.

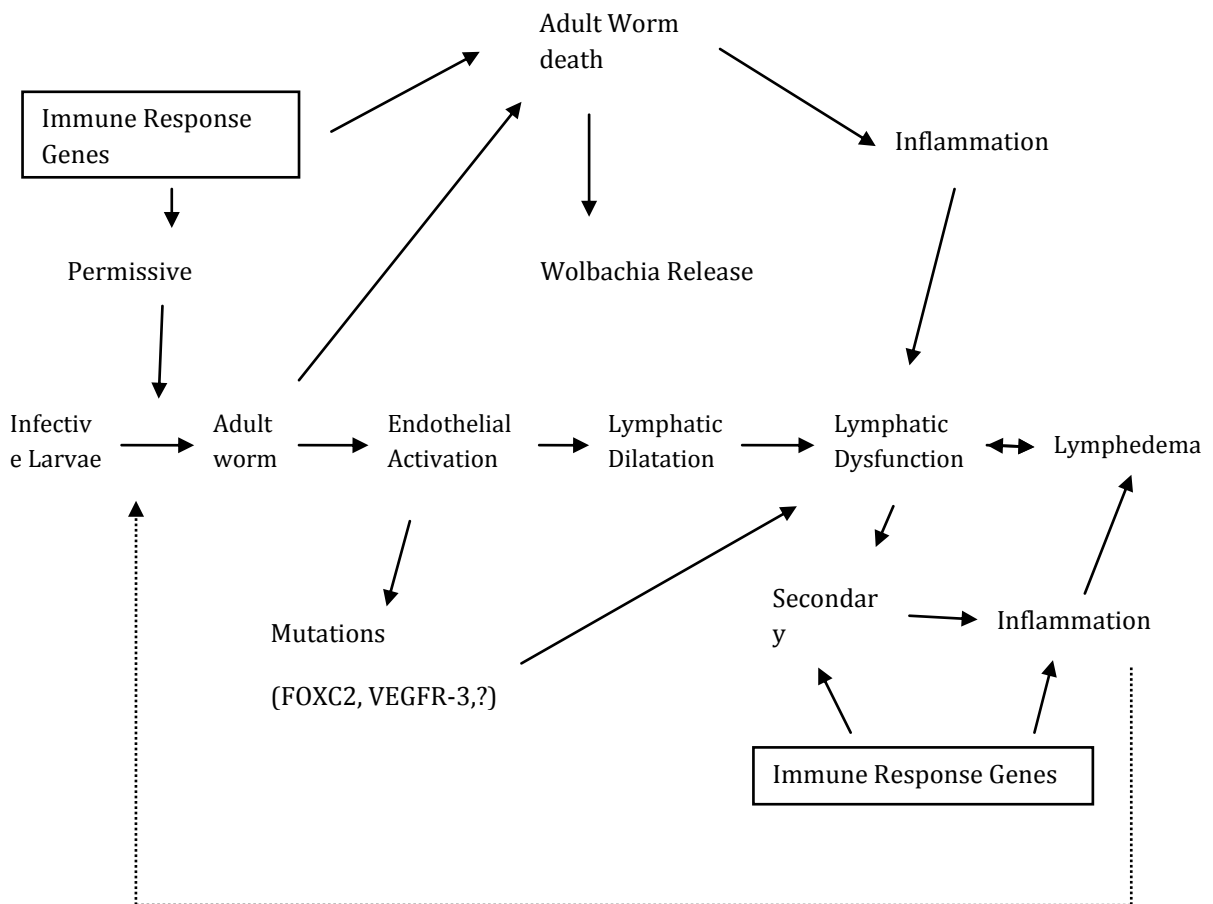


Abbildung 12: Der Verlauf, der für die Pathologie der lymphatischen Filariose verantwortlich sein könnte

VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor 3): Mutationen im Gen führen zu einem hereditären Lymphödem

FOXC 2 (forkhead box C2); MFH-1(mesenchyme forkhead 1): wird u.a. in den Lymphgefäßen exprimiert und kann zur Bildung von Bindegewebe führen und eine Rolle bei Metastasenbildung spielen.

Weitere Entzündungsmediatoren

LPS bewirkt zwar den Haupteffekt des Entzündungsprozesses, aber es gibt zusätzliche Mediatoren, die Wolbachia im Zuge eines Angriffes durch unser Immunsystem freisetzen kann (siehe Tab. 6).

Hitzeschockproteine und hier im speziellen Hsp60, spielt eine wichtige Rolle im täglichen Zellalltag. Es beeinflusst die Signaltransduktion und die Faltung von Proteinen. Bei bakteriellen Infektionen stimuliert es die Produktion von Antikörpern und die Aktivität von T-Zellen. Studien zeigen, dass das Wolbachia Hsp60 über TNF- α und IL-6 die Produktion von Makrophagen stimulieren kann. Diese Reaktion läuft unbeeinflusst von anderen Serumwerten über das Zusammenspiel mit CD14 und TLR 4 ab. Ferner wird Hsp60 im Zuge einer Stressantwort z.B. auf Antibiotika Behandlung von Wolbachia vermehrt sezerniert und könnte eine Rolle im Entzündungsprozess spielen (43).

Ein weiterer wichtiger Entzündungsmediator ist die bakterielle DNA. Antigen-präsentierende Zellen (z.B. Makrophagen oder dendritische Zellen) und natürliche Killerzellen werden zur Produktion verschiedener Zytokine angeregt (z.B. IL-12, IL-8 etc.), die zur Produktion von Th1 Zellen beitragen. Auch B-Zellen werden zur Herstellung von polyklonalen Immunglobulinen motiviert. Im Gegensatz zu LPS und Hsp60 ist diese Reaktion TLR 4 unabhängig. Dennoch kann diese bakterielle DNA in verschiedenen Geweben (z.B. Lunge) zu beträchtlichen Entzündungsreaktionen führen und in Mäusen sogar einen toxischen Schock verursachen (43).

Im Jahr 2004 konnte Brattig et al. nachweisen, dass auch das Oberflächenprotein *Wsp* von Wolbachia möglicherweise einen Einfluss auf den Verlauf der Filariose haben könnte. *Wsp* kann das menschliche Immunsystem über die Rezeptoren TLR 2 und TLR 4 stimulieren und eine Entzündungskaskade in Gang setzen. Auffallend ist, dass *Wsp* die Sekretion von IgG1 fördert und nicht wie die bei der Filarieninfektion üblichen IgE und IgG4. Überdies konnte aufgezeigt werden, dass eine Infektion vor allem durch Th1 Zellen beantwortet wird und, dass dies wahrscheinlich auf das Vorkommen von Wolbachia zurückzuführen ist. Es wird ebenso angenommen, dass eine Immunreaktion nicht durch den Insektenstich ausgelöst wird, da das Insekt an sich keine Wolbachia übertragen kann, sondern durch den Wurm mit den darin enthaltenen Bakterien (47).

Zusätzliche Untersuchungen hinsichtlich der Immunreaktion auf *Wsp* beweisen, dass das Immunsystem von infizierten Menschen hauptsächlich auf das *Wsp* von L3-Larven reagiert als auf das des adulten Wurmes. Der Tod von L3-Larven hat folglich eine größere Auswirkung auf die Entwicklung einer späteren akuten oder chronischen lymphatischen Filariose als der adulte Wurm (48).

In einer weiteren Studie von Hise et al., 2007 wurde entdeckt, dass durch *Wsp* eigentlich keine Produktion von TLR 4 stattfindet. Im Unterschied zur Studie Brattig et al. 2004 wurden ausschließlich rekombinante Proteine verwendet. In der Studie von Hise et al. wurde *Wsp* von nativen Bakterien verwendet, das anscheinend schwächere Reaktionen des Immunsystems hervorruft. Gründe dafür könnten sein, dass diese native Bakterienlösung weniger Endotoxine und LPS enthalten hat, oder das native Protein bindet anders an den TLR 2 (44).

Immune Personen

Studien in endemischen Gebieten haben ergeben, dass sich in manchen Individuen eine Immuntoleranz gegenüber *Onchocercus volvulus* entwickeln kann. Man nimmt an, dass ungefähr 1-5% der Bevölkerung mit hoher Expositionsrate eine Immunität besitzen, d.h. diese Personen zeigen keinerlei klinische Symptome. Auch Menschen zwischen 20 und 40 Jahren können eine Infektion mit Hautfilarien durch eine angepasste Immunreaktion eindämmen. Turaga et al., 2000 konnten zeigen, dass das Immunsystem sowohl von immunen Personen als auch von infizierten Personen durch gezielte Opsonisierung die Zahl an L3 Larven limitieren kann (49).

Ferner konnte eine Reihe an Unterschieden zwischen der Cytokin-Expression von Personen mit und ohne klinischen Symptomen aufgezeigt werden:

- Mononukleare periphere Zellen von immunen Personen sezernieren mehr Interleukin-5 und teilweise auch mehr IFN- γ als die Zellen von infizierten Personen.
- Bei nicht infizierten Menschen konnte ein höherer Wert an GM-CSF⁸ auf eine Exposition mit L3, auf wachsende L3 und auf männliche adulte Würmer und eine

⁸ Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

Th2-Reaktion auf weibliche adulte Würmer und auf Mikrofilarien in der Haut ausgewiesen werden.

- Bei infizierten Menschen konnte nur eine Th2 Reaktion dokumentiert werden (49).

Die Bedeutung von IL-5 und GM-CSF besteht darin, dass beide Faktoren zu einer Erhöhung der Immunzellen Produktion (Neutrophile, Eosinophile) führen und IL-5 eine Wanderung bzw. Anlockung von eosinophilen Granulozyten bewirkt. Diese Reaktion (Th2 mediiert) gepaart mit einer spezifischen Antikörper-Produktion gegen die Larven, könnte eine Möglichkeit der Abwehr darstellen. Diese Annahme wird durch zahlreiche Versuche in vitro unterstützt. Ebenso wies eine kleine Gruppe von immunen Personen eine Th1 vermittelte Reaktion auf, die aber weiterer Untersuchungen bedarf (49).

Durch den Nachweis einer Immunreaktion gegen männliche adulte Würmer, wird angenommen, dass immune Personen die Entwicklung einer Filariose oder einer okkulten Infektion steuern könnten, indem ihr Immunsystem die Fortpflanzung und das Wachstum der Filarien behindern kann. Diese Hypothese könnte den Weg für die Entwicklung einer wirksamen Impfung ebnen. Diese Vakzine müsste jedoch eine Reihe an Antigenen enthalten, da die menschliche Immunreaktion individuell sehr variieren kann (49).

Untersuchungen an Kindern von infizierten Müttern in Gebieten mit 80-90% Prävalenz haben ergeben, dass diese eine verminderte T-Zell-Reaktion auf die Infektion mit Mikrofilarien zeigen. Diese verminderte T-Zell Reaktion entwickelte sich wahrscheinlich während der Schwangerschaft oder im Neugeborenenalter. Es wurden weniger Ausbrüche einer Filariose beobachtet, wobei von diesen Kindern eine frühere und höhere Infektionsrate mit Filarien und eine höhere Parasitenrate toleriert werden (41), (46).

Wurmwirt	Immunreaktion	Freigesetzte Moleküle	Wolbachia-Wirt	Moleküle von Wolbachia
Katze	Antikörper	IgG	D.immitis	<i>Wsp</i> ⁹
Mensch	Antikörper	IgG	O.volvulus	Hsp60
Maus	Makrophagen	TNF- α , IL-1 β , NO	B.malayi	LPS ¹⁰
Mensch	Makrophage	TNF- α , IL-8, IL-10, HLA-DR	O.volvulus	LPS
Mensch	Neutrophile	Chemotaxin Rezeptor	O.volvulus	Wahrscheinlich LPS
Mensch	Vermutet: entgegengesetzte Reaktion ¹¹ nach DEC ¹² Therapie	IL-8, TNF- α , IL-6, LBP, IL-10, sTNF-R	B.malayi	Vermutet: LPS

Tabelle 6: Die ausgelöste Immunreaktion in den untersuchten Filarienarten

⁹ Oberflächenprotein von Wolbachia

¹⁰ Lipopolysaccharid

¹¹ Aufgrund Absterbens des Wurmes, Reaktion auf freigesetzte Bakterien

¹² Diethylcarbamazepin

3.4 AUSWIRKUNG VON WOLBACHIA AUF DIE FORTPFLANZUNG BEI INSEKTEN

Wolbachia kann die Fortpflanzung in den Insekten, welche ihre Wirte darstellen, auf verschiedene Weise manipulieren:

1. Feminisierung

Unter Feminisierung versteht man, dass Wolbachia versucht direkt auf die Entwicklung der Eier Einfluss zu nehmen um eine Weitergabe an die nächste Generation zu sichern und eine Verbreitung der Infektion zu fördern.

Feminisierung kann in haploiden und diploiden Organismen auftreten. Mit Wolbachia infizierte Weibchen produzieren doppelt so viele weibliche Nachkommen (50).

2. Pathenogenese

Bei der Pathenogenese oder Jungfernzeugung entstehen die Nachkommen von Insekten aus unbefruchteten Eizellen.

In haploiden Spezies werden Männchen aus unbefruchteten haploiden Eiern hervorgebracht und die Weibchen aus befruchteten diploiden Eiern. Wolbachia manipuliert die haploiden Eier insofern, indem es den Chromosomensatz verdoppelt und die männlichen Eier diploid macht. Somit kommt es zur asexuellen Produktion von Weibchen und folglich zur doppelten Erzeugung von weiblichen Nachkommen (50).

3. Male killing/Töten von männlichen Nachkommen

Die Gründe für die Tötung von männlichen Nachkommen bei Insekten durch Wolbachia sind die erhöhte Weitergabe von Wolbachia an die nächste Generation durch die überlebenden Weibchen und die bessere Überlebenschance der Weibchen (kann zum Beispiel den Bruder fressen und dadurch besser überleben) (51).

4. Cytoplasmatische Inkompatibilität

Unidirektionale Inkompatibilität: Wenn ein mit Wolbachia infiziertes Männchen sich mit einem nicht infizierten Weibchen und umgekehrt oder beide infiziert sind, reproduziert. Infizierte Weibchen haben eine größere Chance zur Reproduktion als nicht infizierte Weibchen.

Bidirektionale Inkompatibilität: Sowohl Männchen als auch Weibchen sind mit unterschiedlichen und inkompatiblen Wolbachia-Bakterien infiziert. In inkompatiblen Kreuzungen wird die Mitose gestoppt und nur die mütterlichen Chromosomen verfolgen die Mitose weiter.

In diploiden Organismen endet diese Art von Mitose in einem Abbruch der Embryogenese und im Tod des Embryos.

In Haplodiploiden führt dies zum Tod der Männchen.

Bei der bidirektionalen Inkompatibilität sind also beide Wege tödlich. Die Vorteile dieser Art von Fortpflanzungskontrolle sind noch nicht klar abzugrenzen. Bei einem ausgewogenen Vorkommen von Wolbachia gleichen sich die Vorteile auf männlicher und weiblicher Sicht aus. Jedoch ist das meistens nur ein Übergangszustand. Wenn die Infektionsrate über 50% steigt, haben die Weibchen einen Vorteil gegenüber Männchen (50), (51).

4. THERAPIE

Die starke Verbreitung der Filariose in der Bevölkerung stellt ein wirtschaftliches und auch ein sozial-ökonomisches Problem dar. Man versucht mithilfe von Anthelminthika, wie zum Beispiel Diethylcarbamazepin, Ivermectin und Albendazole, den Parasitenbefall zu reduzieren. Auch die operative Entfernung von Hautknoten bei *Onchocercus volvulus* oder eine Bekämpfung der Insektenvektoren wurden versucht. Durch die Erforschung von Wolbachia hat sich ein neuer Therapieansatz mittels Antibiotika entwickelt. Doch wird weiter erforscht, welche Antibiotika, in welcher Dosierung und Kombination am wirksamsten für eine langzeitige Eliminierung sind, und ob eine Antibiotika-Therapie vorteilhafter gegenüber einer Anthelminthika-Therapie ist.

4.1 THERAPIE MIT ANTHELMINTIKA

Viele betroffene Staaten benutzen in ihren Hilfsprogrammen, die auch von der WHO durchgeführt werden, ein meist halbjährliches „Ein-Medikamenten-Schema“. Die am häufigsten eingesetzten Medikamente sind Diethylcarbamazepin (DEC) und Ivermectin welche in Kombination mit Albendazol verabreicht werden können.

Im Rahmen eines solchen Programmes der WHO wurde eine Studie in Indien (52) durchgeführt, die die Wirkung von DEC und DEC in Kombination mit Albendazol auf lymphatische Filariose untersuchte. Die Forscher kamen zu dem Schluss, dass eine Kombination klare Vorteile betreffend Reduktion der Parasitenlast nach sich bringt. Außerdem eliminiert die Kombination der Medikamente die Parasiten am besten im Kindesalter. Dennoch bietet diese Therapie keinen Stillstand einer Weiterverbreitung der lymphatischen Filariose in Indien, da der Effekt der Medikamente nach Monaten wieder nachlässt und das Programm der WHO nur halbjährliche Einnahmen vorsieht. Zusätzlich besteht die laufende Übertragung durch die spezifischen Insektenvektoren (52), (53).

Ivermectin vernichtet wie DEC Mikrofilarien in der Haut nur für einige Monate. Eine Rückfallswahrscheinlichkeit von 20% wurde beobachtet. Grund für diesen Rückfall ist die Tatsache, dass Ivermectin nicht die adulten Würmer (die bis zu 15 Jahre leben können) abtötet, sondern nur die späte Form der Mikrofilarien und keinen Einfluss auf die Embryogenese bei adulten Nematoden hat (54).

Die Anthelmintika Suramin und Praziquantel führen zu einer Sterilisation von Würmern, jedoch nicht auf lange Zeit gesehen (54).

Ein Nachteil der Therapie mit Anthelmintika stellt die Aussetzung des Immunsystems nach Abtöten des Wurmes mit einer großen Bakterienmenge dar. Durch das Anthelmintikum wird die Mikrofilarie am Übergang zum adulten Wurm getötet. Unter der Annahme, dass die Mikrofilarien mit *Wolbachia* infiziert sind, kommt es zu Bakteriämie-ähnlichen Symptomen, sowie zu Juckreiz und Lymphadenopathie, die wiederum untypisch für eine Bakteriensepsis sind. Diese Reaktion wurde erstmals 1948 von Mazzotti nach Behandlung einer Onchocercose mit Diethylcarbamazepin beschrieben (→ Mazzotti-Reaktion). Das Krankheitsbild besteht aus Fieber, Hypotension, Tachykardie, Adenitis, Juckreiz und Arthralgien. Mazzotti nahm damals an, dass diese Reaktion auf eine Freisetzung von Antigenen der sterbenden Parasiten zurückzuführen ist (55).

Keiser et al., 2002 zeigten, dass nach der Behandlung mit DEC ein erhöhter Gehalt an Bakterien-DNA im Blut feststellbar ist und somit die intrazellulären Bakterien eine wichtige Rolle im Zuge der Mazzotti-Reaktion spielen. Eine zusätzliche Behandlung mit antibakteriellen Medikamenten könnte zudem die Schwere dieser post-Behandlungsreaktion senken (55).

4.2 THERAPIE MIT ANTIBIOTIKA

Bereits 1993 haben Forscher die Wirkung vom Antibiotikum Tetracyclin auf Adultwürmer entdeckt. Allerdings wurde dieses Antibiotikum in Verbindung mit einer anderen bakteriellen Infektion eingesetzt. Die Forscher erkannten, dass die Entwicklung von L3 auf L4 Larve und von L4 auf L5 Larve von *Brugia pahangi* gestört wurde. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt kein Zusammenhang mit *Wolbachia* hergestellt werden. Trotzdem ist diese Entdeckung für weitere Forschungen wichtig, da das Tetracyclin gegen eine bakterielle Infektion mit Rickettsien wirkt. Da angenommen wird, dass *Wolbachia* zur Ordnung der Rickettsiales gehört, könnte sich der Effekt dieses Antibiotikums auf *Wolbachia* erklären (56).

1999 (57) konnte durch ein Experiment mit infizierten Mäusen (*Litosomoides sigmodontis*) erstmals die Wirksamkeit von Tetracyclinen gegen Filarien aufgezeigt werden. Es wurden zwei Auswirkungen beobachtet: Zum Einen eine Unterbrechung der Entwicklung und

Reifung von Filarien (Effekt auf Makrofilarien) und zum Anderen ein Abbruch der Embryogenese und des Hervorbringens von Mikrofilarien (Effekt auf Mikrofilarien). In Mäusen, die mit *A.vitae* infiziert waren, wurden keine solchen Effekte beobachtet, da *A.vitae* nicht mit diesem Endosymbionten besiedelt ist. Aus diesem Grund nahmen die Forscher damals an, dass Antibiotika gegen die intrazellulären Bakterien wirksam sind (57).

Bandi et al., 1999 versuchten durch Infektion von Mäusen und Hunden festzustellen, ob Tetracycline auf Wolbachia oder auf den Wurm wirken. Dazu infizierten sie eine Gruppe von Mäusen mit *Brugia pahangi* und begannen eine Tetracyclin-Therapie für eine Dauer von 15 und 25 Tagen. Danach wurden Gewebe entnommen, mittels Elektronenmikroskopie auf die verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen. In der infizierten Gruppe fanden die Forscher Zellreste, die Überreste von Wolbachia sein könnten. Um die Hypothese über eine Beteiligung von Wolbachia zu beweisen, verwendeten die Forscher mit *Dirofilaria immitis* infizierte Hunde (*Dirofilaria immitis* ist größer als *Brugia pahangi*). Mithilfe von PCR konnten sie einen Beweis dafür finden, dass Tetracycline einen Effekt auf Wolbachia zeigen und, dass es dadurch zu einer Produktion von Eiern ohne Wolbachia kommt. Diese Experimente konnten darlegen, dass Wolbachia in Filarien vorkommt, dass Tetracycline eine Wirkung auf die vertikale Weitergabe von Wolbachia haben und beide Arten von Würmern ein Sistieren ihrer Embryonalentwicklung nach 25 Tagen Therapie aufweisen. Es bleibt jedoch unklar, ob der Effekt von Tetracyclin primär dem Wurm und sekundär Wolbachia gilt oder ob der Effekt unabhängig auf beide wirkt (58).

Auch die Forschergruppe von Hoerauf et al. versuchte im Jahre 2000 mithilfe von *Litosomoides sigmodontis* die Wirkung anderer Antibiotika zu testen, aber mit mäßigem Erfolg. Sie kamen zu dem Schluss, dass zu diesem Zeitpunkt Tetracyclin die beste Therapie sei und, dass keine Wirksamkeit von Makroliden, Ciprofloxacin und Chloramphenicol bestimmbar war. Jedoch wurde nicht ausgeschlossen, dass der fehlende Effekt eher auf ein mangelndes Vordringen der Antibiotika zu den Endosymbionten zurückzuführen sei. In dieser Studie wurden immunelektronische und immunhistologische Verfahren angewendet, mit denen die Wechselwirkung zwischen Hsp60 der Bakterien und der Antikörper sichtbar und der Sitz der Bakterien auffindig gemacht werden konnte. Zu diesem Zeitpunkt war Tetracyclin das einzige effektive Antibiotikum gegen Filariose in vivo (59).

Ähnliche Resultate wurden bei Untersuchungen in vitro von Smith und Rajan, 2000, erzielt. Es wurde die Entwicklung von L3 zu L4 Larven mittels Tetracyclin gestoppt, wobei angenommen wurde, dass Tetracycline eine andere Wirkungsweise haben. Durch Polymerasechainreaction (PCR) konnte nach der Therapie noch immer Bakterien-DNA festgestellt werden. Das Medikament scheint möglicherweise nur die Interaktion zwischen Wurm und Bakterium zu stören, jedoch nicht das Bakterium selbst. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bewiesen werden, da die Bakterien durch die diffuse Verteilung in der Elektronenmikroskopie nicht auffindbar waren (56). Hier muss allerdings noch erwähnt werden, dass die Therapie nur 10 Tage lang andauerte. Ein Vergleich betreffend der Auffindungsrate und der Auswirkung auf die Bakterien ist jedoch mit der oben genannten Studie von Hoerauf et al., 2000, bei der eine Therapie über 28 Tage durchgeführt wurde, mit Skepsis zu betrachten.

Eine Therapie mit Tetracyclinen führt zu:

- a. Abbruch der Embryogenese und zu degenerierten Embryos
- b. Sterilität der weiblichen Würmer
- c. Fehler im Larvenwachstum
- d. Tod von Adulten (22)

Hoerauf et al., 2000 untersuchten in einer Studie in Ghana mit freiwilligen Teilnehmern im Alter zwischen 18 und 50 Jahren die Wirkung von einer 6-wöchigen Therapie mit Doxycyclin auf *Onchocercus volvulus*. 4 Monate nach der Behandlung wurden die Onchocercome (Hautknoten mit ein bis sechs weiblichen Würmern) auf den Erfolg der Therapie mittels Immunhistologie, morphologische Veränderungen und semiquantitative PCR geprüft. Es kam zu einer Reduktion von Bakterien in den weiblichen Würmern und zu einer Verminderung der Embryonenlast pro weiblichen Wurm. Dies zeigt, dass Doxycyclin im Gegensatz zu Ivermectin den Wirkungsschwerpunkt in der frühen Phase der Larvenentwicklung hat und, dass es eine weitere Möglichkeit der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien darstellt. Ein weiterer Vorteil dieser Erkenntnis ist, dass gravierende Nebenwirkungen und hohe Herstellungskosten durch die Gabe von Doxycyclinen vermieden werden können. Es stellt sich nun die Frage, ob eine kürzere Therapie mit höheren Dosierungen, den gleichen Effekt zeigt (60).

Hoerauf et al., 2001 wiederholten diese Studie in Ghana unter veränderten Bedingungen und verwendeten Doxycyclin in Kombination mit Ivermectin. Eine Gruppe von Patienten bekam die Kombination, die andere Gruppe bekam nur Ivermectin verabreicht. 18 Monate nach der Therapie konnten bei Patienten, die mit der Kombination behandelt wurde, noch immer keine neu auftretenden Mikrofilarien in der Haut festgestellt werden. Dies zeigt, dass eine Kombinationstherapie auf Dauer einen Erfolg bringen kann und, dass die Weitergabe von Wolbachia gestoppt werden konnte (54).

Die 2003 veröffentlichte Studie von Hoerauf et al. fasst die Wirkung von Doxycyclin nach einer 6-wöchigen Therapie mit 100 mg pro Tag wie folgt zusammen:

- a. Langsame Reduktion von Wolbachia (über 18 Monate anhaltend)
- b. Degeneration der meisten Embryos nach 5 Monaten und Beendigung der Mikrofilarienentwicklung nach 11 Monaten (über 18 Monate anhaltend)
- c. Reduktion von Spermatozoen in weiblichen Würmern
- d. Fehlen eines Effekts auf Mikrofilarien und Makrofilarien
- e. Teils eingeschränkte Spermatogenese (61)

Trotz einer Antibiotika-Therapie wurden noch immer vereinzelt Bakterien mittels PCR nach 18 Monaten gefunden. Die Bedeutung der überlebenden Bakterien ist unklar, da keine Aktivität bezüglich Unterstützung der Embryogenese oder der Mikrofilarien-Produktion nachgewiesen werden konnte. Zum damaligen Zeitpunkt war allerdings noch nicht feststellbar, ob diese Bakterien wieder aktiv werden könnten (61).

Ebenso konnte aufgezeigt werden, dass Doxycyclin gegen *Wuchereria bancrofti* die gleichen Effekte zeigt wie gegen *Onchocercus volvulus*. Die größte Wirksamkeit zeigt Doxycyclin in einer Unterbrechung der Embryogenese durch Vernichtung der Endosymbionten. Dies führt zu einer langsamen Abnahme an Mikrofilarien. Es konnte aber kein direkter Effekt vom Antibiotikum auf Mikrofilarien aufgezeigt werden (62).

In einer doppelt-blinden randomisierten Studie in Tansania wurden 72 Patienten auf den Effekt von Doxycyclin auf *Wuchereria bancrofti* getestet (63). 34 Personen bekamen Doxycyclin für 8 Wochen, 38 Personen bekamen ein Placebo. Nach 5, 8, 11 und 14 Monaten wurden sie auf Mikrofilarien, Antigenrate und adulte Würmer im Ultraschall getestet. Nach 14 Monaten kam es zu einer Abnahme der Mikrofilarienlast und zu einer Reduktion der adulten Würmer, die durch die Abnahme der Antigenrate und den fehlenden

Nachweis im Ultraschall bestätigt wurde. Durch den langsamen Abfall der Antigenrate wurde keine akute Immunreaktion auf das Absterben der Parasiten ausgelöst, wie zum Beispiel bei der Gabe von Anthelmintika berichtet wurde. Trotz der guten Ergebnisse kommt die Forschergruppe zu dem Schluss, dass Antibiotika nicht für die Massenbehandlung geeignet sind, aufgrund verschiedener Kontraindikationen und Nachteile (63).

In einer weiteren Studie von Debrah et al., 2006 mit Patienten, die an Symptomen der lymphatischen Filariose (Lymphödeme) litten, fanden die Forscher heraus, dass eine anfängliche 6-wöchige Therapie und anschließende Behandlung mit Ivermectin und Albendazol zu einer wesentlichen Verbesserung führte und dass möglicherweise Doxycycline auf die Faktoren VEGF-C/s VEGFR-3 (beide spielen eine Rolle bei hereditärem Lymphödem und könnten eine Auskunft über die Schwere der sich entwickelnden Filariose geben) eine Auswirkung haben. Dies könnte die Entwicklung einer schweren lymphatischen Filariose verlangsamen und zu einer Verbesserung der Lymphödeme führen. Dennoch ist die Hypothese betreffend beider Faktoren noch nicht ausreichend bewiesen worden (64).

In einem ähnlichen Versuch wie für Doxycycline wurde von Hoerauf et al., 2008 das Antibiotikum Azithromycin (wirkt gegen Chlamydien, Mycoplasmen und kann auch bei Kindern verwendet werden) auf seine Wirksamkeit bei Onchocercose getestet. Ebenso wie Doxycyclin wurde Azithromycin über 6 Wochen in zwei unterschiedlichen Dosierungen (250 mg/Tag 23 Personen oder 1200 mg/Woche 14 Personen) verabreicht. Die wöchentliche Gabe konnte leider keine adäquaten Ergebnisse liefern und auch die tägliche Einnahme konnte keinen positiven Effekt auf die Onchocercose zeigen. Trotzdem konnte nachgewiesen werden, dass die Wolbachiazahl unter einen bestimmten Wert fallen muss, um eine Auswirkung auf die Parasiten zu erzielen (65).

Ein weiteres Medikament, das für Kinder zugelassen ist, wurde auf die Wirksamkeit bei Onchocercose getestet: Rifampicin. Es wurde in einer 2- und 4-wöchigen Therapie verabreicht. Zwar wurde eine Reaktion auf die 4-wöchige Therapie (reduzierte Embryogenese) dokumentiert, jedoch konnte kein Ergebnis wie bei Doxycyclin erreicht werden. Dessen ungeachtet, kann es als eine Möglichkeit zur Bekämpfung weiter erforscht werden, mit dem Hauptaugenmerk auf die Behandlung von Kindern (66).

4.3 NACHTEILE UND VORTEILE EINER ANTIBIOTIKA THERAPIE

Ein Nachteil in der Therapie mit Doxycyclin besteht in der Tatsache, dass Doxycyclin aufgrund von logistischen Gründen und diverser Kontraindikationen (Schwangerschaft, Stillzeit, nicht geeignet für Kinder unter 9 Jahren) nicht für eine Massenbehandlung geeignet ist, wie zum Beispiel Anthelmintika (67).

Außerdem muss eine relativ lange Therapiedauer eingehalten werden, die in verschiedenen Studien nicht verkürzt werden konnte, da sonst der Effekt bedroht wäre. Eine Monotherapie mit Doxycyclin über 14 bis 21 Tage konnte keine adäquate Reduzierung der Parasitenlast erzielen. Jedoch wies eine Kombinationstherapie mit Rifampicin in infizierten Mäusen eine Verringerung der Last auf (68).

Ein weiterer Nachteil könnte die notwendige hohe Dosierung der Antibiotika sein. In Studien wurde eine unzureichende Wirkung von Antibiotika geschildert, die dadurch begründet wird, dass *Wolbachia* teilweise in Vakuolen abgekapselt leben und so die Therapie nicht ausreichend wirksam sein kann (69).

Die Vorteile einer Doxycyclin-Therapie sind die Zulassung des Medikamentes für den Menschen und die bereits bekannten und gut erforschten Wirkmechanismen mit den verbundenen Nebenwirkungen. Überdies stellt die breite Verfügbarkeit von Antibiotika einen weiteren Vorteil für eine Therapie dar.

4.4 MODERNE THERAPIEANSÄTZE

Neben der weiteren Forschung an einer Antibiotika-Therapie, wurde auch ein großes Forschungsinteresse an alternativen Behandlungsmöglichkeiten geweckt.

2004 versuchten Forscher einen Impfstoff auf Basis eines geklonten Gens aus „immunem“ Personen herzustellen. Dafür wurde das Protein „ALT-2“ benutzt, das bei Wirtsinfektion von der L3-Larve exprimiert wird. Im Mausmodell wurden zwei Arten an Vakzinen getestet: eine DNA-Vakzine und ein Impfstoff auf Basis eines rekombinanten Proteins. Es zeigte sich, dass die DNA-Impfung Vorteile hinsichtlich Stimulation der humoralen und zellulären Immunreaktion, Herstellung und Vakzinstabilität bietet. Allerdings konnte eine geringere Antikörperbildung bei DNA-Impfungen beobachtet werden. Die Begründung liegt darin, dass die Vakzine mit rekombinantem Protein mehr Antikörper beinhalten, und

dass möglicherweise das Freud's Adjuvans und das Fehlen von Murinolonucleotiden eine Beeinflussung auf die Antikörperproduktion ausüben (70).

Ein weiterer Therapieansatz könnte die Hemmung von Stoffwechsellzymen darstellen. *Wolbachia* besitzt keine Pyruvatkinase und muss stattdessen die Pyruvat-Phosphate-Dikinase verwenden. Diese Dikinase katalysiert die Umsetzung von AMP, PPi und Phosphoenolpyruvat zu ATP, Pi und Pyruvat. Da viele Organismen aber eine Pyruvatkinase besitzen und keine Dikinase, könnte die Dikinase ein gutes Ziel für einen Therapieansatz abgeben. Allerdings wurden noch keine weiteren Forschungen zur genauen physiologischen Rolle dieses Enzyms in *Wolbachia* angestellt und die Verwendung dieses Enzyms als Therapieansatz ist noch nicht wirklich geklärt (71).

Auch *in vitro* wurde eine Behandlung mittels Bestrahlung versucht. Es wurde eine größere Anzahl an *Brugia malayi* bestrahlt, mit dem Erfolg, dass die adulten Würmer einen dosisabhängigen Effekt zeigten. Es konnten ähnliche Auswirkungen auf die Würmer wie bei einer Doxycyclin-Therapie beobachtet werden. Die Bestrahlung reduzierte die Embryogenese und die Mikrofilarienproduktion in den Weibchen. Auffallend war, dass die Männchen bei niedrigeren Dosierungen früher Symptome aufwiesen als die Weibchen. Dieser Effekt konnte entweder auf die Anwesenheit von *Wolbachia* oder auf die direkte Wirkung der Bestrahlung zurückgeführt werden. Mikrofilarien, die sich trotzdem weiterentwickelten, beinhalteten nur mehr geschädigte oder abgestorbene *Wolbachia*. Fraglich bleibt, ob diese Mikrofilarien weiter frei von *Wolbachia* fortbestehen. Da eine Bestrahlung auch für andere Erkrankungen (z.B. verschiedene Krebsarten) einsetzbar ist und Würmer meist sensitiver auf Bestrahlung reagieren, muss ein Bestreben in einer weiteren Erforschung dieser Art von Therapie liegen. Es könnte in Zukunft möglich sein, Würmer durch spezielle Moleküle oder Antikörper zu markieren und diese dann gezielt zu bestrahlen. Diese Methode ist noch nicht komplett erforscht und es gilt vorerst nachzuweisen, ob die Bestrahlung eine direkte Auswirkung auf *Wolbachia*, auf die Würmer oder auf beide hat (72).

5. DISKUSSION

Trotz der Anzahl der von Filarien befallenen Menschen, konnte erst in den letzten 10 Jahren mit Hilfe der molekularbiologischen Techniken, das intrazelluläre Vorkommen von Wolbachia in Filarien bestätigt werden. Die Forschungsdaten ermöglichten erst in den 90er Jahren einen neuen Therapieansatz mit Antibiotika und Anthelmintika.

Wolbachia sind, wie in dieser Arbeit erläutert, obligat intrazelluläre Bakterien, die auf verschiedenste Substanzen der Filarie angewiesen sind. Im Gegenzug allerdings ist auch die Filarie auf Wolbachia angewiesen und nicht zuletzt deshalb ist anzunehmen, dass Wolbachia eher einen Symbionten darstellt, denn einen parasitär lebenden Organismus.

Betrachtungen in Kapitel 3 legen nahe, dass einige Stoffwechselformen für eine Therapie mittels Antibiotika zielführend erscheinen könnten. Weiters könnten viele biochemische Wege oder Syntheseprozesse durch gezielte genetische Veränderung oder chemische Einwirkungen gestört werden. Allerdings stellt die Suche nach Substanzen, die weder humanpathogen noch zytotoxisch wirken, die Wissenschaft vor ernst zu nehmende Herausforderungen.

Kapitel 3.3 beleuchtet die Rolle von Wolbachia hinsichtlich menschlicher Immunreaktion. Auffallend ist, dass die Bakterien sehr wohl in unser Immunsystem eingreifen und beim Absterben einer Filarie eine Immunreaktion hervorrufen können. Die verschiedenen Forschergruppen sind sich nach wie vor nicht einig, ob und inwiefern die Bakterien menschliche Entzündungsmediatoren (wie z.B. TLR 4, 2, TNF etc.) beeinflussen und wie man möglicherweise in Zukunft über eine Modulation dieser Mediatoren eine Filariose steuern könnte.

Eine Therapie mit Anthelmintika ist wie in zahlreichen Studien bewiesen, nur sehr begrenzt wirksam. Diese Medikamente senken zwar die Anzahl an Filarien, setzen aber den Körper einer Vielzahl von Bakterien aus. Eine Kombination zwischen Anthelmintika und Antibiotika zeigt zwar eine Besserung bezüglich Parasitenlast, doch halten die vielen Nebenwirkungen und Nachteile der Antibiotika diesem Effekt entgegen. Aufgrund der Nebenwirkungen können viele Antibiotika Kindern nicht gegeben werden. Desweiteren ist die optimale Therapiedauer zur effektiven Senkung der Bakterienlast nach wie vor festzusetzen.

Zusätzlich bleibt die Frage nach einem adäquaten Therapieschema weiter offen: Welche Dosierung ist die richtige, um die Bakterienlast zu verringern, welcher Zeitraum muss eingehalten werden (14-21 Tage habe keinen wirklich guten Effekt gezeigt), und welches

Antibiotikum ist letztendlich das Richtige? Überdies bedeutet eine Doppeltherapie (Antibiotika und Anthelmintika) eine enorme Zunahme der Kosten, die für ärmere Länder, die am meisten durch diese Krankheiten betroffen sind, nicht finanzierbar sind. Aufgrund langdauernder und hochdosierter Therapien müssen die Nebenwirkungen von Antibiotika additiv behandelt werden.

Die Entwicklung einer Impfung steht erst in den Anfängen und es ist zurzeit nicht absehbar, ob überhaupt eine Impfung entwickelt werden kann.

Zum Einen beeinflusst Wolbachia eine Reihe an Entzündungsvorgängen und die Entwicklung einer DNA-Vakzine zeigte in den ersten Versuchen eine zu geringe Antikörperentwicklung. Zum Anderen bleibt die Frage offen, inwiefern eine Impfung Auswirkungen auf die Filarie und auf die intrazellulären Bakterien zeigt. Erreicht der Impfstoff überhaupt das vermeintliche Ziel der Zerstörung dieser intrazellulär lebenden Bakterien oder werden nur Antikörper gegen die Filarie gebildet? Damit ergibt sich wieder das Problem der Aussetzung einer Flut an Bakterien nach Tod der Filarie und ein Krankheitsbild, das einer Bakteriensepsis ähnelt.

Ein anderer Therapieansatz wäre die Beeinflussung von Stoffwechsellzymen, jedoch fehlt es noch an weiteren Grundlagenforschungen. Ob man mit der Beeinflussung eines Stoffwechsellzyms sowohl Wirt als auch Symbiont beeinflussen kann und welches Enzym das letztendlich bewerkstelligen könnte, bleibt weiter offen und bietet ein hohes Maß an Forschungspotenzial.

Der Versuch die Krankheit durch Bestrahlung zu bekämpfen, bietet zwar einen kurzfristigen Therapieerfolg, doch muss auf die Langzeitwirkungen von Bestrahlung und die zeitliche Beschränkung dieser Therapieform verwiesen werden. Es könnte durch diese Therapieform die Erkrankung weitgehend eingeschränkt werden, doch es besteht die hohe Wahrscheinlichkeit einer Reinfektion. Des Weiteren ist nicht klar, welche Auswirkungen die Bestrahlung auf Wirt und Menschen zeigt, sowie die finanzielle Förderung dieser Therapieform.

Die Symbiose zwischen Wolbachia und Filarioidea ist ein Gebiet, welches zwar nun seit 10 Jahren intensiv erforscht wird, aber noch immer nicht wirklich klar ist, welche Konsequenzen diese Symbiose auf den Wurm und als Weiterführung auf den Menschen hat und welche Bedeutung hinsichtlich der Therapieform diese Symbiose darstellt. Antibiotika zeigen eine eingeschränkte Wirksamkeit, eine Kombination mit Anthelmintika ist zwar wirksam aber die Details wie Therapiedauer, Dosierung wurden noch immer nicht

geklärt, und neuere Therapieformen wie Beeinflussung von Stoffwechsellzymen, Impfstoffe, Strahlentherapie befinden sich erst am Anfang ihrer Erforschung.

So bleibt die Hoffnung, dass eine weitere Erforschung, die Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden, weitere Therapiemöglichkeiten oder einen Fortschritt der bereits versuchten Therapien erschließen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **F.H. Kayser, E.C. Böttger et al.** *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. s.l. : Thieme, 11. überarbeitete Auflage 2005.
2. **Encarta, Microsoft.** Microsoft Encarta Online-Enzyklopädie 2009. *MSN Encarta*. [Online] MSN, 2009. [Zitat vom: 2. Juni 2009.]
http://de.encarta.msn.com/encyclopedia_761565831/Filarien.html.
3. **G. Kluxen, A. Hörauf.** Okuläre Onchozerkose: Wolbachien haben eine Schlüsselrolle. 2007, 104:p.860-865, online publiziert: 20.September 2007: Springer Medizin Verlag 2007.
4. **M. Casiraghi, O. Bain, R. Guerrero et al.** Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematode: evidence for the loss during evolution. *International Journal for Parasitology*. 2004, Bde. 34, p.191-203.
5. **Chemotherapie, Österreichische Gesellschaft für Antimikrobielle.**
<http://www.infektionsnetz.de/ParasitenWuchereria.phtml>. [Online] Österreichische Gesellschaft für Antimikrobielle Chemotherapie. [Zitat vom: 16. April 2009.]
<http://www.infektionsnetz.de/ParasitenWuchereria.phtml>.
6. **S. Longato, M. Mair.** med 1 Gesundheit im Internet. [Online] [Zitat vom: 16. April 2009.]
<http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Tropen/Wuermer/Onchozerkose/>.
7. **Werren, J.H.** Biology of Wolbachia. *Annual Review Entomol.* 1997, 42: p.587-609.
8. **Ghelelovitch, S.** Sur le déterminisme génétique de la sterilité dans le croisement entre différentes souches de *Culex autogenicus* Roubaud. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 1952, 24: p.2386-88.
9. **Laven, H.** Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution.* 1951, 5: p.370-75.
10. **Laven, H.** Speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1959, 24: p.166-73.
11. **J.H. Yen, A.R. Barr.** New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature.* 1971, 232: p.657-58.
12. **M.J. Taylor, A. Hoerauf.** Wolbachia Bacteria of Filarial Nematodes. *Parasitology Today.* 1999, Bd. 15, no.11:p.437-442.
13. **McLaren, D.J.** Micro-organisms in filarial larvae (Nematoda). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1975, 69: p.509-514.
14. **A.L. Vincent, J.K. Portaro, L.R. Ash.** A comparison of the body wall ultrastructure of *Brugia pahangi* with that of *Brugia malayi*. *J. Parasitol.* 1975, 63: p.567-70.
15. **W.J. Kozek, M. Figueroa.** Intracytoplasmic bacteria in *Onchocercus volvulus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1977, 26: p.663-678.
16. **J.J. Legrand, E. Legrand-Hamelin, P. Juchault.** Sex determination in *Crustacea*. *Biol. Rev.* 1987, 62: p.439-70.

17. **R. Stouthamer, R.F. Luck, W.D. Hamilton.** Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87: p.2424-27.
18. **Sironi, M.** Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995, 74: p.223-227.
19. **C. Bandi, B. Slatko, S.L. O'Neill.** *Wolbachia* Genomes and the Many Faces of Symbioses. *Parasitology Today.* 1999, Bd. vol.15, no.11: p.428-429.
20. **K. Pfarr, A. Hoerauf.** The Annotated Genome of *Wolbachia* from the Filarial Nematode *Brugia malayi*: What it means for progress in antifilarial Medicine. *PLoS Medicine.* Volume 2, April 2005, Bde. Issue 4; p.289-292.
21. **N. Lo, C. Paraskevopoulos, K. Bourtzis et al.** Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 2007, Bd. 57, p.654-657.
22. **K.M. Pfarr, A. Hoerauf.** A niche for *Wolbachia*. *Trends in Parasitology.* 2006, Bd. 23, 1; p.5-7.
23. **A.G. Hise, I. Gillette-Ferguson, E. Pearlman.** The role of endosymbiotic *Wolbachia* bacteria in filarial disease. *Cellular Microbiology.* 6, 2004, Bd. 2, p.97-104.
24. **N. Lo, M. Casighari, E. Salati et al.** Letter to the editor: How many *Wolbachia* supergroups exist? *Molecular Biology and Evolution.* 19, 2002, Bde. 3: p.341-346.
25. **C. Bandi, T.J.C. Anderson et al.** Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematode. *The Royal Society.* 1998, 265: p.2407-2413.
26. **K. Fenn, M. Blaxter.** *Wolbachia* genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. *Trends in Parasitology.* February 2006, Bd. 22, 2; p.60-65.
27. **Weisberg, W.G.** Polyphyletic origin of bacterial parasites. In *Intracellular parasitism.* Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 1-15, 1989.
28. **C. Bazzocchi, W. Jamnongluk et al.** wsp Gene Sequences from the *Wolbachia* of Filarial Nematode. *Current Microbiology.* 2000, Bd. 41, pp.96-100.
29. **L. Baldo, J.H. Werren.** Revisiting *Wolbachia* Supergroup Typing based on wsp: Spurious Lineages and Discordance with MLST. *Current Microbiology.* 2007, Bd. 55, p.81-87.
30. **L. Baldo, N. Lo, J.H. Werren.** Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology.* 2005, Bd. 187, no.15:p.5406-5418.
31. **M. Casiraghi, S.R. Bordenstein, L. Baldo et al.** Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup and evidence for fruther diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology.* 2005, 151: p.4015-4022.
32. **Blaxter, M.** Symbiont Genes in Host Genomes: Fragments with a Future? *Cell Press.* Cell Host & Microbe, October 2007, p.211-213.

33. **J. Foster, M. Ganatra, et al.** The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biology*. 3: e121, 2005.
34. **C. Bandi, A.J. Trees, N.W. Brattig.** Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. *Veterinary Parasitology*. 2001, Bd. 98, p.215-238.
35. **Selkirk, Smith, Thoam et al.** Resistance of filarial nematode parasites to oxidative stress. *International Parasitology*. 28; p.1315-1332, 1998.
36. **N. Brattig, U. Rathjens, M. Ernst et al.** Lipopolysaccharide-like molecules derived from Wolbachia endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. *Microbes and Infection*. 2000, Bde. 2; p.1147-1157.
37. **A. Doetze, J. Satoguina, G. Burchard et al.** Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by th3/tr1 type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a Th1 to Th2 shift. *International Immunology*. 2000, Bd. 12, 5: p.623-630.
38. **I. Gillette-Ferguson, A.G. Hise, H.F. McGarry et al.** Wolbachia-induced Neutrophil Activation in a Mouse Model of Ocular Onchocerciasis (River Blindness). *Infection and Immunity*. Oct.2004, Bd. 72, no.10: p.5687-5692.
39. **I. Gillette-Ferguson, K. Daehnel, A.G. Hise et al.** Toll-like Receptor 2 regulates CXC Chemokine Production and Neutrophil Recruitment to the Cornea in *Onchocercus volvulus*/Wolbachia-induced Keratitis. *Infection and Immunity*. Dec.2007, Bd. 75, 12: p.5908-5915.
40. **K. Daehnel, I. Gillette-Ferguson, A.G. Hise et al.** Filaria/Wolbachia activation of dendritic cells and development of Th1-associated responses is dependent on Toll-like receptor 2 in a mouse model of ocular onchocerciasis (river blindness). *Parasite Immunology*. 2007, 29: p.455-465.
41. **A. Hoerauf, J. Satoguina, M. Saefel, S. Specht.** Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunology*. 2005, 27: p.417-429.
42. **Taylor, M.J.** Wolbachia in the Inflammatory Pathogenesis of Human Filariasis. *Annals New York Academy of Sciences*. 2003, 990: p.444-449.
43. **M.J. Taylor, H.F. Cross, L. Ford et al.** Wolbachia bacteria in filarial immunity and disease. *Parasite Immunology*. 2001, 23: p.401-409.
44. **A.G. Hise, K. Daehnel, I. Gillette-Ferguson et al.** Innate Immune Responses to Endosymbiotic Wolbachia bacteria in *Burgia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88 and Mal but not TLR4, TRIF or TRAM. *The Journal of Immunology*. 2007, 178: p.1068-1076.
45. **L. Al-Riyami, C.A. Egan et al.** Failure of ES-62 to inhibit T-helper type 1 responses to other filarial nematode antigens. *Parasite Immunology*. 2008, 30: p.304-308.

46. **T.B. Nutman, V. Kumaraswami.** Regulation of the immune response in lymphatic filariasis: perspective on acute and chronic infection with *Wuchereria bancrofti* in South India. *Parasite Immunology*. 2001, 23: p.389-399.
47. **N.W. Brattig, C. Bazzocchi, C.J. Kirschning et al.** The major surface protein of *Wolbachia endosymbionts* in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *The Journal of Immunology*. 2004, 173: p.437-445.
48. **T.J. Lamb, L. LeGoff, A. Kurniawan et al.** Most of the Response elicited against *Wolbachia* Surface Protein in filarial nematode infection is due to the infective larval stage. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004, 189: p.120-127.
49. **P.S.D. Turaga, T.J. Tierney, K.E. Bennett et al.** Immunity to Onchocerciasis: Cells from Putatively Immune Individuals produce enhanced levels of Interleukin-5, Gamma Interferon, and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor in response to *Onchocercus volvulus* larval and male worm antigen. *Infection and Immunity*. Apr.2000, Bd. 68, no.4: p.1905-1911.
50. **S. Charlat, G.D.D. Hurst, H. Mercot.** Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*. April 2003, Bd. 19, 4; p.217 - 223.
51. **H. Mercot, D. Poinso.** Infection by *Wolbachia*: from passengers to residents. *Comptes Rendus Biologies*. 2009, 332: p.284-297.
52. **R. Rajendran, I.P. Sunish, T.R. Mani et al.** Impact of two annual single-dose mass drug administration with diethylcarbamazine alone or in combination with albendazole on *Wuchereria bancrofti* microfilaraemia and antigenaemia in South India. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*. 2004, 98: p.174-181.
53. **H. Helmy, G.J. Weil, A.S.T. Ellethy et al.** Bancroftian filariasis: effect of repeated treatment with diethylcarbamazepine and albendazole on microfilaraemia, antigenaemia and antifilarial antibodies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006, 100: p.656-662.
54. **A. Hoerauf, S. Mand, O. Adjei et al.** Depletion of *Wolbachia* endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. *The Lancet*. 2001, Bde. 357: p.1415-1416.
55. **P.B. Keiser, S.M. Reynolds, K. Awadzi et al.** Bacterial Endosymbionts of *Onchocercus volvulus* in the Pathogenesis of posttreatment reactions. *The Journal of Infectious Diseases*. 2002, 185: p.805-811.
56. **H.L. Smith, T.V. Rajan.** Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Experimental Parasitology*. 2000, 95: p.265-270.
57. **A. Hoerauf, K. Nissen-Pfähle, C. Schmetz et al.** Tetracycline therapy targets intracellular bacteria in the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis* and results in filarial infertility. *The Journal of Clinical Investigation*. 1999, Bd. 103, no.1: p.11-18.
58. **C. Bandi, J.W. McCall, C. Genchi et al.** Effects of tetracycline on the filarial worms *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* and their bacterial endosymbionts *Wolbachia*. *International Journal of Parasitology*. 1999, 29: p.357-364.

59. **A. Hoerauf, L. Volkmann, K. Nissen-Paehle et al.** Targeting of Wolbachia endobacteria in *Litomosoides sigmodontis*: comparison of tetracyclines with chloramphenicol, macrolides and ciprofloxacin. *Tropical Medicine and International Health*. 2000, Bd. 5, no.4: p.275-279.
60. **A. Hoerauf, L. Volkmann, C. Hamelmann et al.** Endosymbiotic bacteria in worms as targets for a novel chemotherapy in filariasis. *The Lancet*. 2000, Bde. 355: p.1242-1243.
61. **A. Hoerauf, S. Mand, L. Volkmann et al.** Doxycycline in the treatment of human onchocerciasis: kinetics of Wolbachia endobacteria reduction and of inhibition of embryogenesis in female *Onchocerca* worms. *Microbes and Infections*. 2003, 5: p.261-273.
62. **A. Hoerauf, S. Mand, K. Fischer et al.** Doxycycline as a novel strategy against bancroftian filariasis-depletion of Wolbachia endosymbionts from *Wuchereria bancrofti* and stop of microfilaria production. *Medical Microbiology and Immunology*. 2003, 192: p.211-216.
63. **M.J. Taylor, W.H. Makunde, H.F. McGarry et al.** Macrofilaricidal activity after doxycycline treatment of *Wuchereria bancrofti*: a double-blind, randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005, 365: p.2116-2121.
64. **A.Y. Debrah, S. Mand, S. Specht et al.** Doxycycline reduces plasma VEGF-C/sVEGFR-3 and improves pathology in lymphatic filariasis. *Public Library of Science Pathogens*. 2006, Bd. 2, 9: p.829-843.
65. **A. Hoerauf, Y. Marfo-Debrekeyei, M. Büttner et al.** Effects of 6-week azithromycin treatment on the Wolbachia endobacteria of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Research*. 2008, 103: p.279-286.
66. **S. Specht, S. Mand, Y. Marfo-Debrekeyei et al.** Efficacy of 2- and 4-week rifampicin treatment on the Wolbachia of *Onchocerca volvulus*. *Parasitology Research*. 2008, Bd. 103, no.6: p.1303-1309.
67. **A. Hoerauf, D.W. Büttner, O. Adjei, E. Pearlman.** Science, medicine and the future: Onchocerciasis. *BMJ*. 2003, Bde. 326: p.207-210.
68. **L. Volkmann, K. Fischer, M. Taylor, A. Hoerauf.** Antibiotic therapy in murine filariasis (*Litomosoides sigmodontis*): comparative effects of doxycycline and rifampicin on Wolbachia and filarial viability. *Tropical Medicine and International Health*. 2003, Bd. 8, no.5: p.392-401.
69. **Taylor, M.J.** Elimination of lymphatic filariasis as a public health problem: Wolbachia bacteria of filarial nematodes in the pathogenesis of disease and as a target for control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000, 94: p.596-598.
70. **S. Ramachandran, M.P. Kumar et al.** The larval specific lymphatic filarial ALT-2: Induction of protection using protein or DNA vaccination. *Microbiology and Immunology*. 2004, 48(12): p.945-955.
71. **S. Raverdy, J.M. Foster, E. Roopenian, C.K.S. Carlow.** The Wolbachia endosymbiont of *Brugia malayi* has an active pyruvate phosphate dikinase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2008, 160:p.163-166.

72. **R. Rao, H. Moussa, R.P. Vanderwaal et al.** Effects of gamma radiation on *Brugia malayi* infective larvae and their intracellular Wolbachia bacteria. *Parasitology Research*. 2005, 97:p.219-227.

7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Übersicht über die Taxonomie der Filarien.....	1
Abbildung aus http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/Nematoda.html , cited at 28.1.2010, 12:15	
Abbildung 2: Aufbau eines Fadenwurms	2
Abbildung aus http://de.wikipedia.org/wiki/Fadenwurm , cited at 6.8.2009 17:00	
Abbildung 3: Entwicklungszyklus von <i>Onchocercus volvulus</i>	3
Abbildung aus http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/images/ParasiteImages/AF/Filariasis/O_volvulus_LifeCycle.gif , cited at 6.8.2009 17:30	
Abbildung 4: <i>Wuchereria bancrofti</i>	5
Abbildung aus http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Lymphatic_filariasis/Introduction.htm , cited at 6.8.2009 18:00	
Abbildung 5: <i>Brugia malayi</i>	6
Abbildung aus http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2006/Lymphatic_filariasis/Introduction.htm , cited at 6.8.2009 18:15	
Abbildung 6: Larve eines <i>Onchocercus volvulus</i>	7
Abbildung aus http://www.liv.ac.uk/researchintelligence/issue12/last.html , cited at 6.8.2009 18:30	
Abbildung 7: Wolbachia subkutan & in Oocyten (Pfeile)	10
Abbildung aus http://www.filarijournal.com/content/2/1/10/figure/F2 , cited at 6.8.2009 18:45	
Abbildung 8: Vergleich zwischen Wolbachia und Filarienphylogenie. Der linke Teil basiert auf <i>ftsZ</i> und <i>16S rDNA</i> Analysen. Der rechte Teil stellt die Filarienphylogenie dar. A-D sind die ursprünglich bekannten Supergruppen.	12
Abbildung aus C. Bandi, T.J.C. Anderson et al. Phylogeny of Wolbachia in filarial nematode. The Royal Society. 1998, 265: p.2407-2413	
Abbildung 9: Vermutetes Vorkommen von Wolbachia in Filarien	14
Abbildung aus M. Casiraghi, O. Bain, R. Guerrero et al. Mapping the presence of <i>Wolbachia pipientis</i> on the phylogeny of filarial nematode: evidence for the loss during evolution. International Journal for Parasitology. 2004, Bde. 34, p.191-203	
Abbildung 10: Das Genom von Wolbachia.....	16
Abbildung aus K. Pfarr, A. Hoerauf. The Annotated Genome of Wolbachia from the Filarial Nematode <i>Brugia malayi</i> : What it means for progress in antifilarial Medicine. PLoS Medicine. Volume 2, April 2005, Bde. Issue 4; p.289-292	

Abbildung 11: Immunmodulation von Filarien..... 22
Abbildung aus A. Hoerauf et al. Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunology*. 2005, 27: p.417-429

Abbildung 12: Der Verlauf, der für die Pathologie der lymphatischen Filariose verantwortlich sein könnte..... 26
Abbildung aus P.J. Lammie et al. The pathogenesis of filarial lymphedema: Is it the worm or is it the host? *Annals New York Academy of Sciences*. 2002, 979: p.131-142

8. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Überblick über Filarienarten und Überträger Tabelle aus Fritz H. Kayser, Erik C. Böttger et al. <i>Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie</i> . s.l. : Thieme, 11. überarbeitete Auflage 2005.	4
Tabelle 2: wBm Stoffwechselprodukte, deren mögliche Auswirkungen auf <i>Brugia malayi</i> und die Wirkungen einer Tetracyclin Therapie Tabelle aus K. Fenn, M. Blaxter. Wolbachia genomes: revealing the biology of parasitism and mutualism. <i>Trends in Parasitology</i> . February 2006, Bd. 22, 2; p.60-65.	18
Tabelle 3: Unterschiede im Wolbachiavorkommen zwischen Nematoden und Arthropoden Tabelle aus K.M. Pfarr, A. Hoerauf. A niche for Wolbachia. <i>Trends in Parasitology</i> . 2006, Bd. 23, 1; p.5-7.	19
Tabelle 4: Filarie und Endosymbiont lösen eine Reihe an pro- und antiinflammatorischen Reaktionen aus Tabelle aus N.W. Brattig. Pathogenesis and host responses in human onchocerciasis: impact of <i>Onchocerca filariae</i> and <i>Wolbachia endobacteria</i> . <i>Microbes and Infection</i> . 2004, 6: p.113-128.	23
Tabelle 5: Spektrum an Erkrankungen mit <i>Wuchereria bancrofti</i> ; CFAs (circulating filarial antigens) können noch nicht nachgewiesen werden Tabelle aus B. Ravindran, A.K. Satapathy et al. Protective immunity in human lymphatic filariasis: problems and prospects. <i>Med Microbiol Immunology</i> . 2003, 192: p.41-46.	25
Tabelle 6: Die ausgelöste Immunreaktion in den untersuchten Filarienarten Tabelle aus C. Bandi, A.J. Trees, N.W. Brattig. Wolbachia in filarial nematodes: evolutionary aspects and implications for the pathogenesis and treatment of filarial diseases. <i>Veterinary Parasitology</i> . 2001, Bd. 98, p.215-238.	30